

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Gastroenterologie,
Nephrologie und Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Podozyten-spezifischer *Adck4*-Knockout verursacht ein
nephrotisches Syndrom und führt zum progredienten
Nierenversagen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Hugo

Datum der Promotion: 04.03.2022

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Widmeier, E., Yu, S., Nag, A., Chung, Y. W., Nakayama, M., Fernández-Del-Río, L., Hugo, H., Schapiro, D., Buerger, F., Choi, W. I., Helmstädter, M., Kim, J. W., Ryu, J. H., Lee, M. G., Clarke, C. F., Hildebrandt, F. and Gee, H. Y. (2020). ADCK4 Deficiency Destabilizes the Coenzyme Q Complex, Which Is Rescued by 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 31(6), pp. 1191-1211

Die Teilergebnisse dieser Arbeit sind im Rahmen der oben veröffentlichten Mäusestudie zur Behandlung von *Adck4*-Knockout Mäusen mit 2,4-diHB entstanden, dabei insbesondere die Daten der Kontrollen und *Adck4*-Knockout Tiere im Alter von drei bis elf Monaten.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis.....	11
Zusammenfassung	15
Abstract.....	16
1. Einleitung.....	17
1.1 Struktur des Glomerulus	17
1.1.1 Der glomeruläre Filter	18
1.1.2 Podozyten: Funktion und Struktur	21
1.2 Pathologie der Podozyten.....	22
1.2.1 Wie entsteht aus dysfunktionalen Podozyten eine terminale Nierenerkrankung?..	23
1.2.2 Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom	24
1.2.3 Die Suche nach genetischen Ursachen des steroid-resistenten nephrotischen Syndroms	27
1.2.4 Bisher identifizierte Gene	28
1.2.5 <i>ADCK4</i> Mutationen verursachen steroid-resistentes nephrotisches Syndrom	33
1.3 Fragestellung	34
2. Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.2 Chemikalien	36
2.1.3 Genotypisierung	36
2.1.4 Isolation der Maus-Glomeruli.....	37
2.1.5 SDS-PAGE und Immunoblot.....	37
2.1.6 Immunfluoreszenzfärbung	38

2.1.7	Gewebefixation	39
2.1.8	Messung von Albumin, Kreatinin, Harnstoff und Phosphat.....	39
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Mausstämme	40
2.2.2	Genotypisierung	42
2.2.2.1	DNA-Aufreinigung	42
2.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.2.2.3	DNA-Gelelektrophorese.....	43
2.2.3	Herstellung der Glomeruli-Lysate.....	43
2.2.4.	SDS-PAGE und Immunoblot (Western Blot).....	45
2.2.5	Histologie*	46
2.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie*	46
2.2.7	Immunfluoreszenzfärbung	47
2.2.8	Quantitative Assays	47
2.2.8.1	Albumin-Test.....	47
2.2.8.2	Kreatinin-Test (Urin)*	48
2.2.8.3	Kreatinin-Test (Serum)*	49
2.2.8.4	Messung von Albumin, Harnstoff und Phosphat im Vollblut	50
2.2.9	Datenanalytik	50
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Der <i>Adck4</i> -Knockout in Podozyten führte zu einer progredienten Niereninsuffizienz mit glomerulärer Proteinurie.	51
3.1.1	Nachweis des <i>Adck4</i> -Knockouts der Mäuse.....	51
3.1.2	Morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen	53
3.1.3	Gewichtsverlaufsanalyse	54
3.1.4	Verlaufsanalyse des Überlebens	55
3.1.5	Analyse des Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin	56

3.1.6	Analyse von Kreatinin, Harnstoff, Albumin und Phosphat im Serum.....	57
3.1.7	Zusammenfassung der quantitativen Assays	59
3.2	Adck4 defiziente Mäuse entwickeln eine fokale segmentale Glomerulosklerose.	59
3.2.1	Histologische Analyse des Nierengewebes	59
3.2.2	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Nierengewebes.....	63
3.2.3	Immunfluoreszenzanalyse des Nierengewebes.....	64
3.2.4	Zusammenfassung der histologischen und ultrastrukturellen Analysen	67
3.3	Unterschiede im Krankheitsverlauf des chronischen Nierenversagens von weiblichen und männlichen <i>Adck4^{APodozyt}</i> Mäusen.....	67
4.	Methodenkritik.....	71
5.	Diskussion.....	74
5.1	<i>Adck4</i> -Knockout Mäuse entwickelten ein chronisch progredientes Nierenversagen mit globaler Glomerulosklerose	74
5.2	ADCK4 ist essenziell für physiologische Funktionen des Podozyten.....	75
5.3	Einordnung der klinischen Manifestation des ADCK4 Mangels im Spektrum der mitochondrialen Erkrankungen	77
5.4	Die durch <i>Adck4</i> Mangel induzierte Dysfunktion der Podozyten löste eine Aktivierung von Mesangiumzellen aus und beeinflusste die Synthese der Basalmembran im Mausmodell.....	81
5.5	Männliche <i>Adck4</i> -Knockout Mäuse entwickelten ein früher einsetzendes und stärker ausgeprägtes chronisches Nierenversagen als weibliche <i>Adck4</i> -Knockout Mäuse	79
5.6	CoQ ₁₀ Mangel als potenziell behandelbare Erkrankung.....	83
6.	Literaturverzeichnis.....	87
	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	106
	Lebenslauf.....	108
	Publikationsverzeichnis	108
	Originalarbeiten.....	109
	Posterpräsentationen.....	111

Danksagung..... 113

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nephrons mit zugehörigem Tubulussystem (A) und des Glomerulus (B) (modifiziert nach Kriz et al., 2015, 3f.).	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schlitzmembran (modifiziert nach Kawachi und Fukusumi, 2020).	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Kräfte in der renalen Filtrationsbarriere: (A) physiologisch und (B) pathologisch (Darstellung von Fissel and Miner 2018).	21
Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskoaufnahmen: (A) Glomerulus, (B) Podozyt, (C) Fußfortsätze (mit freundlicher Genehmigung von Eugen Widmeier).	22
Abbildung 5: Algorithmus zur Behandlung des nephrotischen Syndroms bei Kindern (modifiziert nach Trautmann et al., 2020)	26
Abbildung 6: Monogenetische Ursachen des steroid - resistenten nephrotischen Syndroms (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Hildebrandt, modifiziert).	29
Abbildung 7: Schematische Darstellung der in den <i>Adck4</i> wildtype Lokus (1) eingefügten synthetischen Kasette (2) (Darstellung von Widmeier et al., 2020).	41
Abbildung 8: Nachweis des podozyten spezifischen Knockouts von <i>Adck4</i> in Mäusen mittels PCR aus DNA und Western Blot.	52
Abbildung 9: Mäuse mit <i>Adck4</i> Mangel zeigten eine erhöhte Morbidität und morphologische Veränderungen der Nieren.	53
Abbildung 10: Analyse des Gewichtsverlaufs.	54
Abbildung 11: Verlaufsanalyse des Überlebens.	55
Abbildung 12: Verlaufsanalyse des Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin.	56
Abbildung 13: Analyse von Kreatinin, Harnstoff, Albumin und Phosphat im Serum.	58
Abbildung 14: Histologische Analyse des Nierengewebes.	60
Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Nierengewebes.	63
Abbildung 16: Die Immunfluoreszenz Analyse des Nierengewebes der <i>Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}</i> Mäuse zeigte glomeruläre Fibrose.	65

Abbildung 17: Vergleich des Verlaufs der Nierenerkrankung von weiblichen und männlichen
Tieren mit Adck4 Mangel 68

Tabelle 1: Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom auslösende Gene.....29

Abkürzungsverzeichnis

2,4-diHB	2,4-Dihydroxybenzoesäure
α SMA	Alpha-smooth muscle actin
A	Adenin
ACEi	Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren
AD	Autosomal-dominant
ADCK4	AarF domain containing kinase 4
AR	Autosomal-rezessiv
ARB	Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CNS	Kongenitales nephrotisches Syndrom
COQ2	Coenzyme Q2 4-hydroxybenzoate-Polyprenyltransferase
COQ6	Coenzyme Q6 monooxygenase
CoQ ₁₀	Coenzyme Q10/Ubiquinone-10
Cre/loxP	cyclization recombination/locus of X-over of P1
Δ Podozyt	spezifischer Podozyten Knockout
DMS	Diffuse mesangiale Sklerose
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
flox	mit loxP-Sequenzen flankierte DNA-Abschnitte
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
G	Guanin
g/L	Gramm pro Liter
GA	Glutaraldehyd
GAMOS	Galloway-Mowat Syndrom
GBM	Glomeruläre Basalmembran
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HE	Hematoxylin – Eosin
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane

kb	Kilobyte
KO	Knock out
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
log	Logarithmisch
MCD	Minimal Change Disease
mg/m ² /h	Milligramm pro Quadratmeter pro Stunde
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
mg/mmol	Milligramm pro Millimol
mM	Millimolar
MP	Maleat - Puffer
MTTL1	Mitochondrially encoded tRNA leucine 1
µg	Mikrogramm
µl/ml	Mikroliter pro Milliliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
NA ₂ EDTA	Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate
NaOH	Natirumhydroxid
nm	Nanometer
NS	Nephrotisches Syndrom
PAS	Perjodsäure – Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDN	Prednisolon
PDSS2	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
pTSNS	Partiell auf Therapie ansprechendes nephrotisches Syndrom
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
SRNS	Steroid - resistentes nephrotisches Syndrom
SSNS	Steroid - sensitives nephrotisches Syndrom
T	Thymin

Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonucleic Acid
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WES	Whole-Exome Sequencing
WT	Wildtyp
WT1	Wilms tumor protein 1
XR	X-chromosomal rezessiv
α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent

Zusammenfassung

Menschen mit Mutationen im *ADCK4* Gen entwickeln ein steroid-resistentes nephrotisches Syndrom, gelegentlich mit extrarenalen Symptomen (neurologisch, kardiologisch, endokrin). Bekannt ist, dass die Fehlfunktion von ADCK4 zu CoQ₁₀ Mangel führt, dennoch ist die Funktion von ADCK4 noch weitestgehend unverstanden. In dieser Arbeit wurde der Phänotyp des podozyten-spezifischen Knockouts des *Adck4* Gens im Mausmodell charakterisiert. Dafür wurden *Adck4* defiziente Mäuse über einen Zeitraum von zehn Monaten beobachtet und monatliche Urin- und Blutproben analysiert. Der *Adck4* Mangel der Mäuse resultierte in einer signifikant verminderten Lebensspanne mit erhöhter Morbidität. Die podozytäre Schädigung in diesem Mausmodell hat eine signifikante Proteinurie und Hypoalbuminämie im Alter von fünf Monaten zur Folge. Das chronische Nierenversagen der Mäuse wurde durch signifikant ansteigende Nierenretentionswerte ab dem siebten Lebensmonat und einer Hyperphosphatämie ab dem neunten Lebensmonat verdeutlicht. Die histologische und ultrastrukturelle Untersuchung der Mäusenieren zeigte eine ausgeprägte Glomerulosklerose mit schwerer interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie, eine starke Destruktion der podozytären Fußfortsätze und eine podozytäre Mitochondriopathie. In den Immunfluoreszenzfärbungen wurde eine Verminderung der podozytenspezifischen Marker Podocin, Nephritin und WT1 gesehen. Dagegen waren der Basalmembranmarker Nidogen und der Myelofibroblastenmarker α SMA erhöht. Dadurch zeigte sich, dass die Malfunktion der Podozyten die umgebenden Zellen des Glomerulus (Endothelzellen, Mesangiumzellen) pathognomonisch beeinflusste. Interessanterweise präsentierten sich die männlichen Mäuse mit *Adck4* Mangel mit einer schnelleren Progression der Nierenerkrankung im Vergleich zu den weiblichen *Adck4*-Knockout Mäusen. Dies zeigte sich in der verkürzten Lebenserwartung und einem stärkeren Anstieg der Nierenretentionsparameter. Zusätzlich ließ sich eine ausgeprägtere Proteinurie mit Hypoalbuminämie und eine stärkere Hyperphosphatämie als bei weiblichen Wurfgeschwister mit *Adck4* Mangel nachweisen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *Adck4*-Knockout im podozyten-spezifischen Mausmodell ein chronisch-progredientes Nierenversagen mit einer schweren globalen Glomerulosklerose zur Folge hat.

(271 Wörter)

Abstract

ADCK4 gene mutations usually cause steroid resistant nephrotic syndrome, occasionally with extrarenal symptoms. *ADCK4* dysfunction results in decreased levels of CoQ₁₀; however, other aspects of its protein functions remain unclear. This publication characterizes the phenotype of podocyte specific *Adck4* deficient mice. *Adck4* knockout mice were examined until the age of ten months. Blood and urine samples were collected monthly. Podocyte damage resulted in proteinuria and low levels of serum albumin in mice around five months of age. Progression to chronic kidney disease was associated with an increase of serum creatinine, blood urea nitrogen around seven months of age and an increase of serum phosphate around nine months of age. Additionally, defects in *Adck4* resulted in decreased survival rates in mice. The analysis of ultrastructural and histological imaging revealed interstitial fibrosis with atrophy of tubules, destruction of the podocyte foot processes, and dysmorphic mitochondria. Immunofluorescent staining showed decreased levels of podocyte specific markers like podocin, nephrin and WT1. Nidogen, a marker for the glomerular basal membrane, and α SMA, marker for activated mesangial cells, were increased focally. We concluded that the loss of podocyte function can influence neighboring cells in the glomerulus, such as mesangial and endothelial cells. Interestingly, male *Adck4* knockout mice developed a faster progression of the chronic kidney disease with higher levels of serum creatinine and blood urea nitrogen and died earlier from end-stage kidney disease than the female *Adck4* knockout mice. Additionally, male *Adck4* deficient mice showed more proteinuria with lower levels of serum albumin than female *Adck4* deficient mice. In summary, *Adck4* knockout mice developed chronic kidney disease with global glomerular sclerosis.

(265 words)

1. Einleitung

1.1 Struktur des Glomerulus

Als kleinste funktionelle Einheit der Niere wird das Nephron bezeichnet. Jede Niere besitzt ca. eine Million Nephrone, durch sie werden täglich aus 1700 l Blut, 170 l Primärharn und schließlich 1,7 l Endharn filtriert bzw. gebildet (Schünke et al., 2015: 295).

Nephrone bestehen aus den im Cortex liegenden Nierenkörperchen (Glomeruli), dem dazugehörigen Tubulussystem und dem Sammelrohr, beide letztere Genannte reichen bis ins Nierenmark (**Abb. 1A**) (Schünke et al., 2015: 295).

Der Glomerulus ist ein Konvolut von spezialisierten Kapillaren, bestehend aus Endothelzellen, dazwischen liegenden, die Endothelien aufspannenden Perizyten (sog. Mesangiumzellen) und dem Kapillarkonvolut außen anliegenden viszerale Epithelzellen (Podozyten). Am glomerulären Hilus gehen die viszerale Epithelzellen in das parietale Epithel mit der sog. Bowman-Kapsel, eine Erweiterung des Tubulussystems, über (**Abb. 1B**). Zwischen viszeralem und parietalem Epithel befindet sich der Kapselraum (Bowman'scher Raum), in den der Primärharn mittels glomerulärem Filtersystem filtriert wird und welcher sich am Urinpol des Glomerulus zum proximalen Tubulus vereinigt (**Abb. 1B**). Diesem Urinpol gegenüber liegt die glomeruläre Hilusregion mit einer zufließenden (afferente) und wegführenden (efferente) Arteriole (**Abb. 1B**). Beim Durchfließen des Blutes durch den Glomerulus wird der Primärharn gebildet. (Silbernagel and Despopoulos, 2012: 156). Dieser besteht aus Wasser und kleinmolekularen Plasmabestandteilen, auch Ultrafiltrat genannt (Silbernagel and Despopoulos, 2012: 162). Auf dem Weg des Primärharns durch das Tubulussystem und das Sammelrohr werden nach Bedarf des Körpers verschiedene Substanzen reabsorbiert oder sezerniert (Silbernagel and Despopoulos, 2012: 156). Dies ermöglicht die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts, damit auch des Blutdrucks, und gewährleistet die Kontrolle des Säure- und Basenhaushaltes (Silbernagel and Despopoulos, 2012: 156).

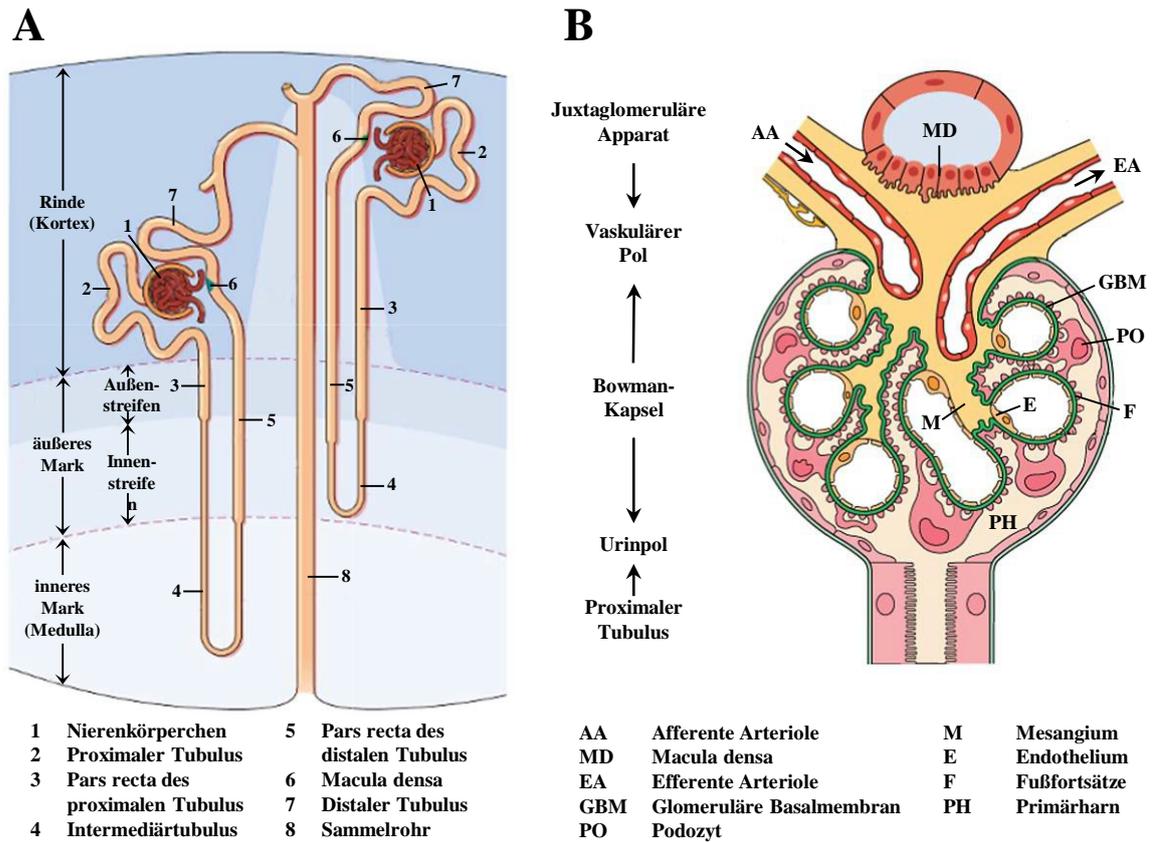


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nephrons mit zugehörigem Tubulussystem (A) und des Glomerulus (B) (modifiziert nach Kriz et al., 2015: 3f.).

1.1.1 Der glomeruläre Filter

Der glomeruläre Filter besteht aus drei verschiedenen Lagen, dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der podozytären Schlitzmembran (Deen et al., 2001). Die Aufgabe des glomerulären Filters ist die Sicherstellung der Ultrafiltration des Blutes. Dafür muss die Passage von großen Mengen Wassers und kleinen Molekülen, ohne den Verlust von Proteinen oder Blutzellen in den Urin, gewährleistet sein (Silbernagel and Despopoulos, 2012: 156).

Eine Besonderheit des glomerulären Filters ist die Ladungsselektivität. In Studien wurde gezeigt, dass neutral geladene Proteine bis zu einer Größe von 4,2 nm die Filtrationsbarriere passieren können (Pollak et al., 2014). Dagegen werden negativ geladene Proteine wie Albumin schon ab einer Größe von 3,6 nm nicht mehr durchgelassen (Pollak et al., 2014).

Die innerste Lage des glomerulären Filters bilden die Endothelzellen. Die glomerulären Kapillaren bestehen aus einer einzelnen Lage von Endothelzellen und sind am Mesangium fest verankert. Das Besondere des glomerulären Endothels ist seine Fenestrierung mit runden bis ovalen Poren im

Durchmesser von 50-100 nm (Kriz et al., 2015: 6). Die meisten dieser Poren besitzen kein Diaphragma, obwohl durch verbesserte Bildgebung entdeckt wurde, dass einige wenige Poren eine wagenradähnliche Membran besitzen (Miner, 2011). Die Größe der Poren und das Fehlen einer weiteren Barriere gewährleistet den großflächigen Übertritt von Wasser und kleinen Molekülen über die erste Lage des glomerulären Filters (Miner, 2011). Die Endothelzellen besitzen eine nach luminal zeigende Glykokalix, welche stark negativ geladen ist (Kriz et al., 2015: 6). Vor allem diese negativ geladene Schicht verhindert den Übertritt von Makromolekülen, wie zum Beispiel Albumin (Pollak et al., 2014).

Angrenzend befindet sich die glomeruläre Basalmembran (GBM) und bildet die mittlere Lage des glomerulären Filters (Deen et al., 2001). Diese besteht aus zwei Lamininschichten und zwei Kollagen-IV-Schichten, welche sowohl von Endothelzellen als auch von Podozyten aufgebaut und erhalten werden (Fissell and Miner, 2018). Diese Komponenten sind durch verschiedene Gerüst- und Anker-Moleküle miteinander verbunden (Fissell and Miner, 2018). Vor allem Integrine wurden als Laminin- und Kollagen-bindende Moleküle identifiziert und sind vermutlich an der Aufrechterhaltung und Stabilisierung der GBM beteiligt (Abrahamson, 2012). Weitere Bestandteile sind Kollagen V, VI, Nidogen 1 und 2, sowie Agrin und Perlecan, zwei Vertreter der Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) (Abrahamson, 2012). Es wurde zunächst vermutet, dass die anionischen HSPGs durch ihre negative Ladung zur glomerulären Filtrationsbarriere beitragen, neuere Studien lassen aber vermuten, dass vor allem die Glykokalix der Endothelzellen und Podozyten zur Aufrechterhaltung der Ladungsselektivität entscheidend ist (Abrahamson, 2012). Die weiteste vom Kapillarlumen entfernte Schicht des glomerulären Filters wird durch die Podozyten gebildet (Deen et al., 2001). Sie besitzen durch eine dicke Schicht aus Sialoglykoproteinen eine negativ geladene Oberfläche, welche zur Ladungsselektivität des glomerulären Filters beiträgt (Kriz et al., 2015: 6f.). Die Fußfortsätze der Podozyten sind mit der GBM verbunden und fingerartig ineinander verschränkt. Dazwischen bilden sie Filtrationsschlitze von 30-40 nm (Kriz et al., 2015: 6f.), welche von der Schlitzmembran ausgefüllt werden (Deen et al., 2001). Die Schlitzmembran wird als komplexe, flexible und mehrschichtige Struktur beschrieben (Conti et al., 2017). Das Gerüst der Schlitzmembran wird aus einem Netzwerk von miteinander verflochtenen Strängen gebildet. Es konnten zwei distinktive Lagen, hauptsächlich bestehend aus Nephrin und Neph1 detektiert werden (Assady et al., 2017). Diese beiden Kompartimente besitzen Poren unterschiedlicher Weite und liegen übereinander, sie bilden damit eine mehrlagige siebartige Struktur (Assady et al., 2017). Die Poren haben eine Größe von 5x15 nm und sind damit kleiner als Albumin. Extrazelluläre Bestandteile der Schlitzmembran sind die Proteine Nephrin, Neph1, P-cadherin, Fat1 und Ephrin- B1 (**Abb. 2**) (Kawachi and Fukusumi,

2020). Die zytoplasmatischen Proteine ZO-1, Podocin, CD2-assoziiertes Protein, MAGI und Par-Complex Moleküle wirken als Verbindungen der Schlitzmembran zum Aktin-basierten Zytoskelett (**Abb. 2**) (Kawachi and Fukusumi, 2020). TRPC6 ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Schlitzmembran mit regulatoriver Funktion (Kawachi and Fukusumi, 2020).

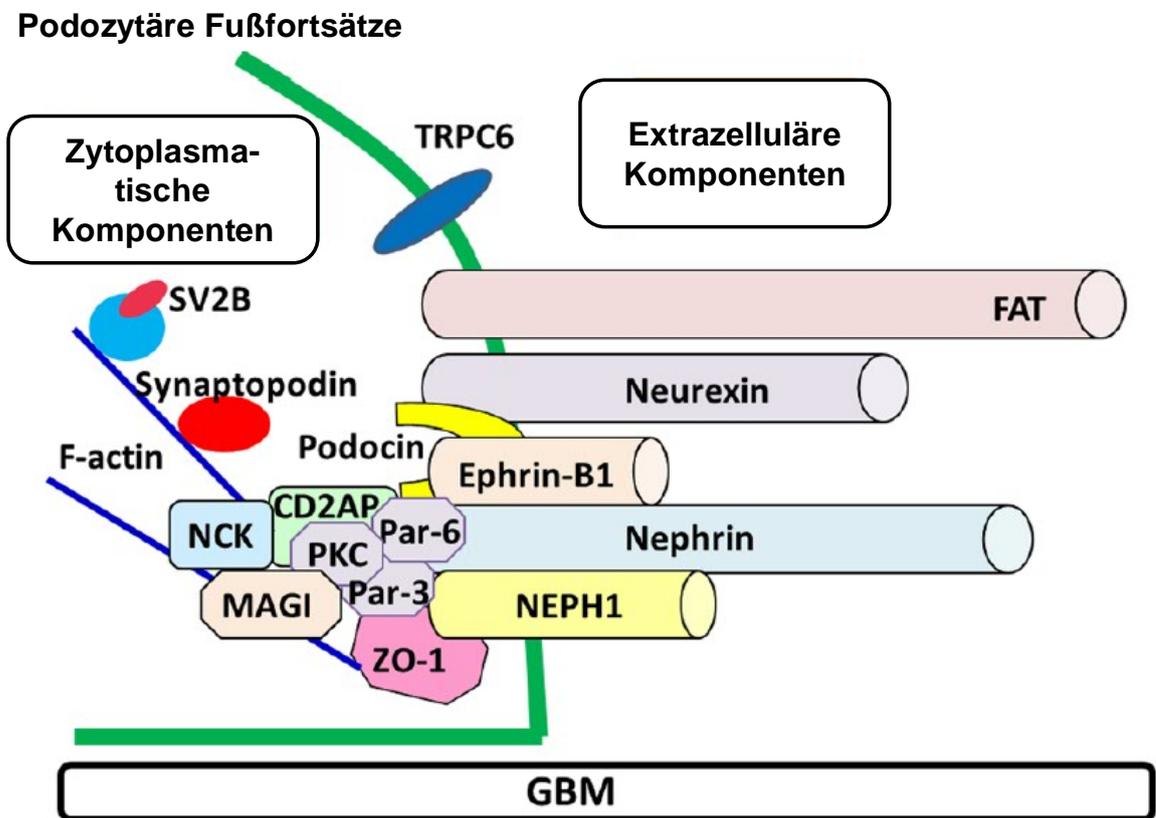


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schlitzmembran (modifiziert nach Kawachi und Fukusumi, 2020). Zu den extrazellulären Komponenten der Schlitzmembran gehören FAT1, Neurexin, Ephrin-B1, Nephrin und NEPH1. Diese sind über die Gerüstproteine Podocin, CD2AP, NCK, ZO-1, MAGI und dem Par-Komplex (aPKC, Par-3, Par-6) mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten verbunden.

Die regelrechte Funktion aller drei Bestandteile und ihre Kommunikation miteinander gewährleisten die Filtrationsleistung des Glomerulus (Pollak et al., 2014). Ein Modell von Fissel and Miner 2018 veranschaulicht die Zusammenarbeit von GBM und Podozyten im renalen Filter. In diesem Modell wird die Kompression der GBM gegen die Fußfortsätze der Podozyten durch den Filtrationsdruck im Glomerulus dargestellt (**Abb. 3A**). Dadurch erhalten die Bestandteile der GBM ihre dichte Struktur und hindern Proteine wie Albumin daran, filtriert zu werden (**Abb. 3A**). Die Kompression der GBM kann nur gewährleistet werden, wenn die podozytären Zell-Zell Kontakte intakt sind und die Fußfortsätze an der GBM befestigt sind. Es tritt Proteinurie auf, wenn

die Podozytenformation gestört wird und damit auch die Struktur der GBM vermehrt durchlässig wird (**Abb. 3B**) (Fissell and Miner, 2018).

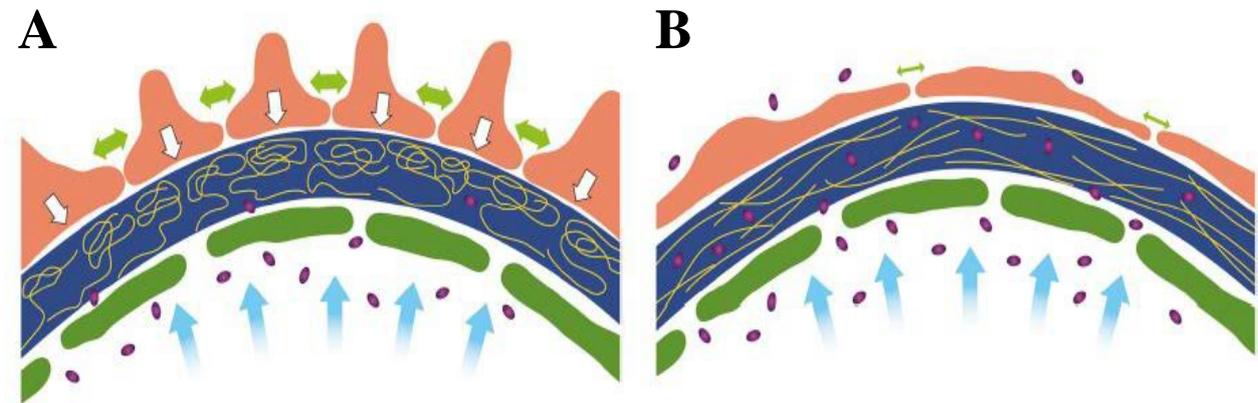


Abbildung 3: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Kräfte in der renalen Filtrationsbarriere: (A) physiologisch und (B) pathologisch (Darstellung von Fissell and Miner 2018).

Physiologisch (A) werden die Bestandteile der GBM (Gelbe Linien) durch den Druck des Wasserflusses (hellblaue Pfeile) durch die Endothelzellen (grün) und die GBM (dunkelblau) gegen die podozytären Fußfortsätze (orange) komprimiert. Die Podozyten wirken durch Zell-Zell-Kontakte, Zellkontraktion (grüne Pfeile) und Verbindungen zur GBM (weiße Pfeile) dem Filtrationsdruck entgegen. Durch die Kompression der GBM-Bestandteile kann Albumin (violette Ovale) die renale Filtrationsbarriere nicht überwinden. Bei glomerulärer Erkrankung (B) sind die podozytären Zellkontakte geschwächt und die Zellkontraktion verringert (grüne Pfeile). Durch die verminderte Kompression der GBM-Bestandteile werden die Lücken der Filtrationsbarriere größer und Albumin kann in dem Bowman'schen Raum übertreten.

1.1.2 Podozyten: Funktion und Struktur

Podozyten sind epitheliale, speziell an ihre Funktion (Blutfiltration) angepasste Zellen und ein wichtiger Bestandteil des glomerulären Filters. Sie sind grundsätzlich postmitotisch, d. h. sie können sich nicht mehr mittels kompletter Mitose teilen, was die Zellen anfällig für Schädigungen macht, da ihre Regeneration eingeschränkt ist (Kim et al., 2001).

Podozyten besitzen einen prominenten Zellkern, einen ausgeprägten Golgi-Apparat, Lysosomen und im Vergleich zu anderen Zellen des Glomerulus (z. B. Mesangiumzellen) viele Mitochondrien (Pavenstädt et al., 2003). Diese Zellorganellen sind vor allem im Zellkörper zu finden, dagegen sind die podozytären Fortsätze arm an Zellorganellen (Pavenstädt et al., 2003). Diese Vielzahl von Zellorganellen wird nicht nur dazu benötigt die eigenen Zellstrukturen aufrecht zu halten, sondern auch um die Bestandteile der GBM zu synthetisieren (Pavenstädt et al., 2003).

Die besondere Form des Podozyten besteht aus einem großen Zellkörper und zahlreichen Zellausstülpungen. Diese Ausstülpungen verzweigen sich weiter und bilden dabei primäre und

sekundäre Fortsätze (**Abb. 4A und B**), welche die glomerulären Kapillaren umfassen (Perico et al., 2016). Die ausdifferenzierten Podozyten besitzen reißverschlussartige tertiäre Fortsätze (**Abb. 4C**), die über fokale Adhäsionen an der GBM befestigt und über die Schlitzmembran miteinander verbunden sind (Perico et al., 2016).

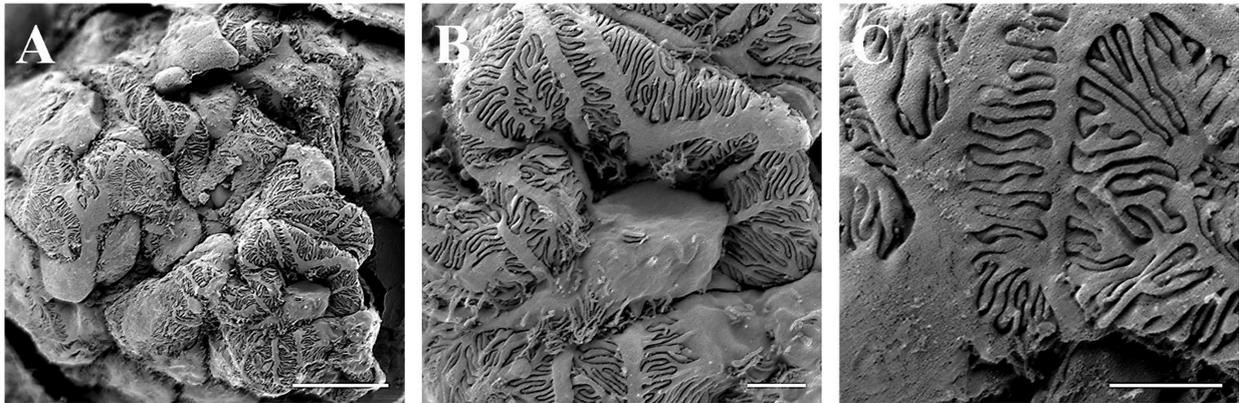


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen: (A) Glomerulus, (B) Podozyt, (C) Fußfortsätze (mit freundlicher Genehmigung von Eugen Widmeier).

Diese besonderen Zell-Zell-Kontakte sind auch wichtig für die Kommunikation zwischen benachbarten Podozyten (Perico et al., 2016). Essenziell für den Erhalt der komplexen Struktur des Podozyten ist ein gut entwickeltes Zytoskelett. Innerhalb des Zellkörpers und der primären Fortsätze besteht das Zytoskelett vor allem aus Vimentin und Desmin, welche Mikrotubuli formen (Pavenstädt et al., 2003). Dagegen dominieren Aktin-basierte Mikrofilbrillen in den sekundären und tertiären Fußfortsätzen (Greka and Mundel, 2012, Pavenstädt et al., 2003). Das Zytoskelett des Podozyten muss sowohl statischen als auch dynamischen Anforderungen gerecht werden. Vor allen die podozytären Fußfortsätze müssen auf veränderte Drücke in den Kapillaren reagieren können, um die Verbindung zur GBM zu erhalten und damit die Funktion des glomerulären Filters zu gewährleisten (Perico et al., 2016). Da der Podozyt nur über seine tertiären Fortsätze an der GBM haftet und der Rest seines Zellkörpers sich im Kapselraum befindet (Neal et al., 2005), ist er bei Verletzungen bzw. Störungen anfällig die GBM-Verbindung zu verlieren und über den Urin verloren zu gehen (Vogelmann et al., 2003).

1.2 Pathologie der Podozyten

Glomeruläre Erkrankungen (Glomerulopathien) sind sowohl im Erwachsenenalter als auch im Kindesalter eine häufige Ursache von chronischen Nierenleiden und terminaler Niereninsuffizienz (Wiggins, 2007, Vivante and Hildebrandt, 2016).

Durch seine Struktur und Funktion (siehe Kapitel 1.1.2) ist der Podozyt anfällig für verschiedene Arten von Schädigungen. Mechanischer Stress, ausgelöst durch glomeruläre Hypertension oder Hyperfiltration kann eine der Ursachen sein (Nagata, 2016). Auch reagiert der Podozyt mit vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf Ischämie und nachfolgender Reperfusion oder den Kontakt mit Toxinen (Nagata, 2016). Dieser oxidative Stress kann ebenso die Zellen schädigen. Außerdem können metabolische Ursachen durch vermehrte Aufnahme von Plasmaproteinen intrinsische Vorgänge am endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien stören und so die Funktion der Zelle behindern (Nagata, 2016). Weitere Ursachen für podozytäre Erkrankungen sind infektiöse oder immunologische Erkrankungen (Wiggins, 2007). Schließlich gibt es noch die heterogene Gruppe der genetisch ausgelösten Pathologien der Podozyten. Auf diese Gruppe wird im Kapitel 1.2.4 genauer eingegangen.

Die klinischen Symptome von podozytären Erkrankungen sind vielseitig und abhängig von ihrer Ursache und begleitenden individuellen Risikofaktoren (nierenschädigende Vorerkrankungen, Vorschädigungen der Nieren, das Zusammenspiel von mehreren Ursachen, anatomische Anomalien).

1.2.1 Wie entsteht aus dysfunktionalen Podozyten eine terminale Nierenerkrankung?

Die Schädigung von Podozyten kann akut z.B. durch toxischen, infektiösen oder immunologischen Stress verursacht werden oder sie verläuft chronisch, hier meist durch Überbeanspruchung (Nagata, 2016, Wiggins, 2007).

Der akut geschädigte Podozyt reagiert mit Änderung seiner Struktur, diese kann sich in Fusion oder Verlust der Fußfortsätze äußern (Johnson et al., 2015: 200). Dort wo Fußfortsätze fusionieren, wird die Schlitzmembran durch eine Art von Tight Junctions ersetzt und dadurch die Filtrationsrate des Glomerulus verringert (Kriz and Lemley, 2017). An Stellen, an denen sich die Fußfortsätze erweitern und sich von der Basalmembran lösen, können Proteine passieren und sind im Urin nachweisbar (Johnson et al., 2015: 200). Obwohl die Frage, ob das Lösen der Fußfortsätze der Grund für Proteinurie ist, nicht abschließend geklärt wurde, da Proteinurie mit und ohne Fußfortsatzverlust vorkommt (Lahdenkari et al., 2004, Liu et al., 2003), gehen beide klinischen Befunde im Erkrankten fast immer einher (Shankland, 2006).

Darüber hinaus hat ein geschädigter Podozyt negative Auswirkungen auf seine benachbarten Zellen. Es wurde ein podozytärer Dominoeffekt beschrieben, welcher durch Crosstalk zwischen benachbarten Podozyten ausgelöst wird (Kobayashi et al., 2015). Dabei wurde beobachtet, dass

im Modell der akut geschädigte Podozyt über Signalwege in benachbarten Podozyten die Konzentration von Integrinen (z.B. ITGA3, ITGB4) reduzieren kann und damit die GBM-Verbindung dieser Podozyten destabilisieren kann (Kobayashi et al., 2015, Nagata, 2016). Andererseits wurde berichtet, dass durch den Verlust der Verbindung via Schlitzmembran von zwei benachbarten Podozyten der Filtrationsfluss und Shear-Stress an dieser Stelle stark zunehmen und das Ablösen der Nachbarpodozyten von der GBM bedingen kann (Kriz and Lemley, 2017). Auf den initialen Verlust von einigen Podozyten reagieren die verbleibenden Zellen mit Hypertrophie, um die vollständige Bedeckung der GBM sicher zu stellen (Kim et al., 2001, Kriz and Lemley, 2017, Wiggins et al., 2005). Die Hypertrophie der Podozyten geht mit Änderung der Proteinsynthese einher; Zytoskelettproteine wie Desmin und Vimentin (Shimojo, 1998) werden vermehrt exprimiert, podozytenspezifische Proteine wie Nephrin werden verringert exprimiert (Wiggins et al., 2005). Dadurch wird langfristig die Funktion des Podozyten eingeschränkt und die Zellen lösen sich ebenfalls von der GBM. Auch wurde beobachtet, dass unter Zellstress Proteine des Zellzyklus exprimiert werden und der Podozyt anfängt sein Genom zu verdoppeln (Lasagni et al., 2013). Da die Mitose nicht vollständig ablaufen kann, hypertrophiert der Podozyt, bildet mehrere Zellkerne aus oder stirbt (Lasagni et al., 2013). Ab einem Anteil von ca. 40 % funktionslosen Podozyten sind die restlichen Zellen nicht mehr in der Lage den Verlust zu kompensieren (Kriz and Lemley, 2017).

Diese Areale mit unbedeckter GBM sorgen für die Adhäsion der kapillären Loops an die Bowman'sche Kapsel (Wiggins, 2007). Durch das Fortschreiten von untergehenden Podozyten werden größere Teile der kapillären Loops nicht mehr von Podozyten bedeckt und reagieren mit Sklerosierung. Die Anzahl von apoptotischen bzw. sterbenden Podozyten korreliert direkt mit der zunehmenden Sklerosierung (Kim et al., 2001). Eine Folge der glomerulären Sklerosierung ist die Atrophie des stromabwärts sitzenden tubulären Systems (Kriz and Lemley, 2017). Ebenso wurde gezeigt, dass Proteinurie an sich die tubulären Zellen schädigt (Johnson et al., 2015: 204). Das bedeutet, das Nephron, die Einheit aus Glomerulus und Tubulussystem, geht über diesen Mechanismus insgesamt zu Grunde. Interstitielle Fibrose schreitet voran, bis die ganze Niere betroffen ist und an Masse verliert (Glassock and Rule, 2012). Klinisch zeigt sich letztlich das Bild eines chronischen Nierenversagens.

1.2.2 Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom

Laut einer Studie von 2016 mit 7037 nierenerkrankten Kindern und jungen Erwachsenen leiden 10,4 % an steroid-resistentem nephrotischem Syndrom (SRNS) (Vivante and Hildebrandt, 2016).

Das SRNS ist damit die zweithäufigste Ursache für eine chronische Niereninsuffizienz für Personen unter 25 Jahren.

Das nephrotische Syndrom bei Kindern ist definiert durch eine Proteinurie von >40 mg/m²/h oder einem Urinprotein/Kreatinin Ratio ≥ 200 mg/mmol und Hypoalbuminurie <25 g/L (Downie et al., 2017). Durch eine Permeabilitätsstörung des glomerulären Filters kommt es zum Proteinverlust über den Urin. Albumin würde mit seinem Durchmesser von 3,6 nm die Endothelporen mit einer Größe von 4,2 nm passieren können, wird aber physiologischerweise durch die negativ geladene Schicht der Endothelzellen zurückgehalten (Pollak et al., 2014). Durch die Schädigung des renalen Filters wird Albumin vermehrt von Patienten und Patientinnen mit nephrotischem Syndrom über den Urin ausgeschieden. Der kompensierende Mechanismus von vermehrter Albuminproduktion durch die Leber ist nur unzureichend (Floege et al., 2015: 189). Die Hypoalbuminämie im Serum spielt vor allem bei Kindern eine große Rolle in der Entwicklung von Ödemen (Floege et al., 2015: 190). Der damit verbundene sinkende kolloidosmotische Druck in den Blutgefäßen sorgt für einen vermehrten Übertritt von Flüssigkeit in den Extrazellulärraum und klinisch zu Ödemen. Der zweite wichtige Mechanismus wird durch den sinkenden intravasalen Druck durch vermehrten Flüssigkeitsverlust ausgelöst (Floege et al., 2015: 190). Das geringere Blutvolumen aktiviert das Renin-Angiotensin-System und sorgt für eine Aldosteron-vermittelte vergrößerte Rückresorption von Natrium in der Niere (Floege et al., 2015: 190). Diese Reaktion soll dem Zustand der relativen Hypovolämie und Hypotension entgegenwirken. Der daraufhin steigende hydrostatische Druck in den Blutgefäßen verstärkt jedoch den Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium, da der hydrostatische Druck den kolloidosmotischen übersteigt (Floege et al., 2015: 190). Des Weiteren ist Hyperlipidämie eine häufige Folge des nephrotischen Syndroms, es gibt mehrere zugrunde liegende Mechanismen (Floege et al., 2015: 191, Downie et al., 2017). Ursache ist einerseits eine vermehrte Synthese von Lipoproteinen in der Leber und zusätzlich fehlt mit dem Albumin ein weiteres Transportmolekül des Cholesterols im Blut (Downie et al., 2017). In der Klinik können Xanthelasmen als Ausdruck der Hyperlipidämie beobachtet werden (Floege et al., 2015: 191). Auch kann eine Neigung zu Hyperkoagulabilität bei mit nephrotischen Syndrom Erkrankten auftreten. Ein verändertes Gleichgewicht zwischen den pro- und antikoagulatorischen Komponenten des Gerinnungssystems durch verstärkte Synthese und vermehrte Ausscheidung von verschiedenen Faktoren sorgt für eine erhöhte Gerinnungsneigung (Floege et al., 2015: 190f.). Außerdem besteht eine vermehrte Thrombozytenaggregationsaktivität (Floege et al., 2015: 190f.). Klinisch kann es zu arteriellen thrombotischen Verschlüssen, als auch zu Thromboembolien kommen (Floege et al., 2015: 190f.). Patienten und Patientinnen mit therapierefraktärem nephrotischen Syndrom entwickeln im Laufe der Krankheit mehrere kardiovaskuläre

Risikofaktoren, darunter Hyperkoagulabilität und Hyperlipidämie, aber auch erhöhten Blutdruck und Urämie (Floege et al., 2015: 191).

Die initiale Therapie von Kindern mit idiopathischem nephrotischen Syndrom beginnt mit der oralen Gabe von Prednisolon für sechs Wochen (**Abb. 5**) (Trautmann et al., 2020). Bei 80-90 % der Kinder älter als ein Jahr mit dem Krankheitsbild eines nephrotischen Syndroms verbessert sich die klinische Symptomatik innerhalb dieses sechs-wöchigen Zeitraums, daher spricht man bei diesen Kindern vom steroid-sensitiven nephrotischen Syndrom (SSNS) (Downie et al., 2017). Erfolgt nach vier Wochen keine vollständige Remission wird die Diagnose des steroid-resistenten nephrotischen Syndroms (SRNS) gestellt (Trautmann et al., 2020). Die vollständige Remission wird definiert durch ein Urinprotein/Kreatinin Ratio im Urin ≤ 20 mg/mmol oder drei bei unterschiedlichen Gelegenheiten negativ getestete Urinstix (Trautmann et al., 2020). Bei Erkrankten mit SRNS sollten genetische und histopathologische Untersuchungen erfolgen, deren Ergebnisse Hinweise auf die Ursache geben können. Kann eine monogenetische Ursache gefunden werden, muss die Prednisolontherapie abgebrochen werden und die Erkrankten werden weiter symptomatisch mit ACEi oder ARB behandelt (Trautmann et al., 2020). Kann keine genetische Ursache des SRNS entdeckt werden, sollte die Behandlung mit zusätzlichen Immunsuppressiva ausgeweitet werden. In Frage kommen hierbei Calcineurin-Inhibitoren, oder Mycophenolate Mofetil (Trautmann et al., 2020).

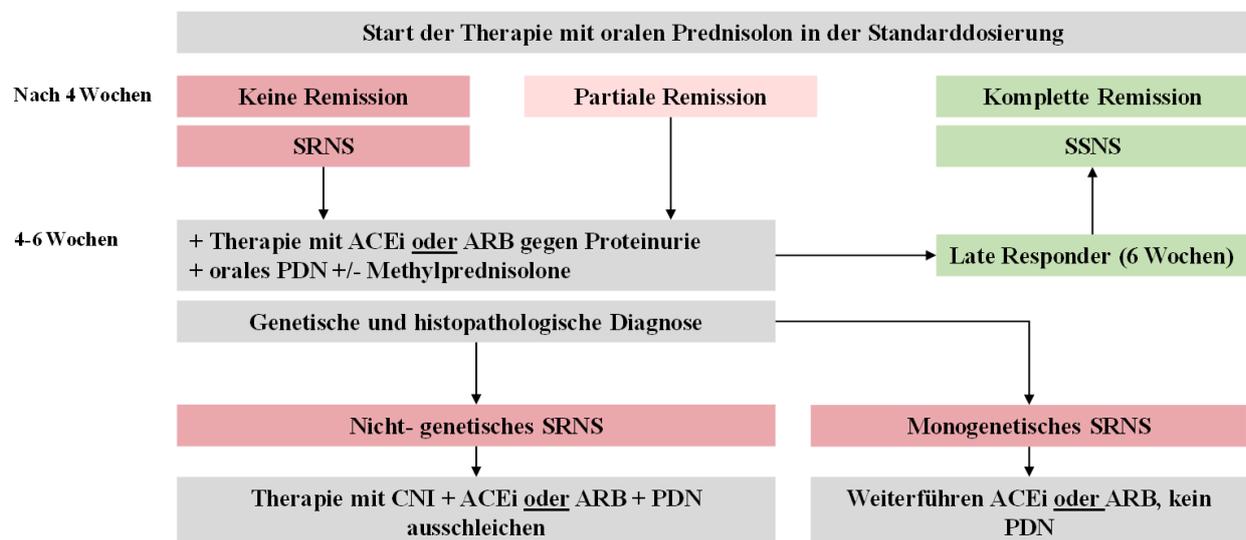


Abbildung 5: Algorithmus zur Behandlung des nephrotischen Syndroms bei Kindern (modifiziert nach Trautmann et al., 2020).

Mehrere Studien zu SRNS bei Kindern zeigten, dass in 24- 32 % der Fälle eine genetische Ursache gefunden werden kann (Rao et al., 2019, Trautmann et al., 2018, Vivante and Hildebrandt, 2016, Warejko et al., 2018). Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Ursache, je jünger

die Patienten und Patientinnen bei Diagnosestellung sind. Die kongenitale Form des SRNS (in den ersten drei Lebensmonaten, CNS) ist in knapp 50 % der Fälle genetisch bedingt (Warejko et al., 2018).

Zur Diagnostik des nephrotischen Syndroms wird regelmäßig eine Nierenbiopsie mit histopathologischer Untersuchung durchgeführt. Typischerweise wird dabei eine Minimal Change Disease (MCD) oder fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) festgestellt, bei Kindern tritt MCD häufiger als FSGS auf (Downie et al., 2017). MCD ist durch ein lichtmikroskopisch unauffälliges Nierengewebe charakterisiert, aber bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigen sich auffällige podozytäre Fußfortsätze, welche nicht mehr vollständig die GBM bedecken (Mason et al., 2015: 210). Die FSGS beschreibt ein weiter fortgeschrittenes und weniger reversibles Krankheitsstadium (Downie et al., 2017). Sowohl elektronenmikroskopisch als auch lichtmikroskopisch ist eine Sklerosierung der Glomeruli mit Ablösen der Fußfortsätze sichtbar (Downie et al., 2017).

1.2.3 Die Suche nach genetischen Ursachen des steroid-resistenten nephrotischen Syndroms

Die Suche nach genetischen Ursachen für steroid-resistentes nephrotisches Syndrom fokussierte sich bisher vor allem auf den monogenetischen Aspekt dieser Erkrankung. Das bedeutet, dass ein Defekt in einem einzelnen Gen das Krankheitsbild auslöst. Dass mehrere Mutationen in verschiedenen Genen ebenso eine Rolle in der Pathogenese dieses Krankheitsbildes spielen, ist zu vermuten, aber schwierig zu detektieren. Die Methode der Wahl, um die vermutlich krankheitsbestimmende Mutation zu finden, ist das Whole-Exome Sequencing (WES). Dafür wird die DNA der Erkrankten extrahiert und das Exom sequenziert. Exons sind die proteinkodierenden Teile des Genoms und machen nur 1-2 % der gesamten DNA aus. Dennoch wurden 85 % bisher entdeckter pathologischer Mutationen im Exom gefunden. Das sequenzierte Exom wurde mit einer Referenz, dem Genome Reference Consortium human genome build 37, human genome 19, verglichen. Die Nukleotide, die nicht mit dem Referenzexom übereinstimmen, werden als Varianten bezeichnet. Diese Varianten wurden anschließend auf ausreichende Qualität der Sequenzierung, bekannten Nukleotidvarianten und Mutationen verglichen und dementsprechend aussortiert. Wichtig ist dabei der Abgleich mit der Liste bereits bekannter krankheitsauslösender Gene, da auch immer wieder neue Mutationen in publizierten Genen entdeckt werden können. Dennoch müssen auch diese Mutationen auf ihre Pathogenität hin untersucht werden. Die übrig gebliebenen Varianten wurden genauer auf potenziellen Krankheitswert, Lage und Genfunktion

überprüft (Yang et al., 2013). Untersucht wurde unter anderem, wie hoch konserviert die Stelle der Mutation in verschiedenen Spezies ist. Das heißt, es wird die Aminosäureabfolge an dieser Stelle des Gens mit der von Genen verschiedener Tiere und Organismen verglichen. Je ähnlicher die Abfolge der verschiedenen Spezies bis zum einfachsten Organismus ist, desto höher konserviert ist diese Stelle des Gens. Es wurde gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der Höhe der Konservierung des Gens und seiner Wesentlichkeit für den Organismus gibt (Dilucca et al., 2018). Ebenfalls wurde untersucht, ob die Mutation an einer strukturell wichtigen Stelle des Proteins liegt. Außerdem wurde nach Interaktionspartnern des Proteins gesucht, welche bekannterweise in der Pathogenese von SRNS eine Rolle spielen und das Expressionsmuster des Proteins in verschiedenen Zellen des Körpers recherchiert. Ist ein potenzielles Gen gefunden worden, wurde versucht mehrere Personen und Familien mit weiteren Mutationen im gleichen Gen zu detektieren. Aus diesem Grund spielen große Patientendatenbanken wie sie im Labor von Prof. Dr. med. Hildebrandt zu finden sind und der Austausch mit anderen Laboren eine große Rolle in der Entdeckung neuer SRNS auslösenden Genen. Der Beweis der Pathogenität kann dann durch funktionelle Versuche erbracht werden (z.B. Mausmodelle).

1.2.4 Bisher identifizierte Gene

In den letzten Jahrzehnten wurden über 50 Gene identifiziert, die - wenn mutiert - SRNS auslösen können (**Tabelle 1**). Diese Entdeckung der monogenetischen Ursachen für SRNS hat den Podozyten ins Zentrum der Pathogenese von SRNS gestellt, da die gefundenen Gene vor allem in den Podozyten exprimiert werden. Besonders wichtig sind hierbei Gene, die in funktionellen Gruppen zusammen gefasst werden können, da ihre Interaktion Aufschlüsse über die Pathogenese des Krankheitsbildes geben kann.

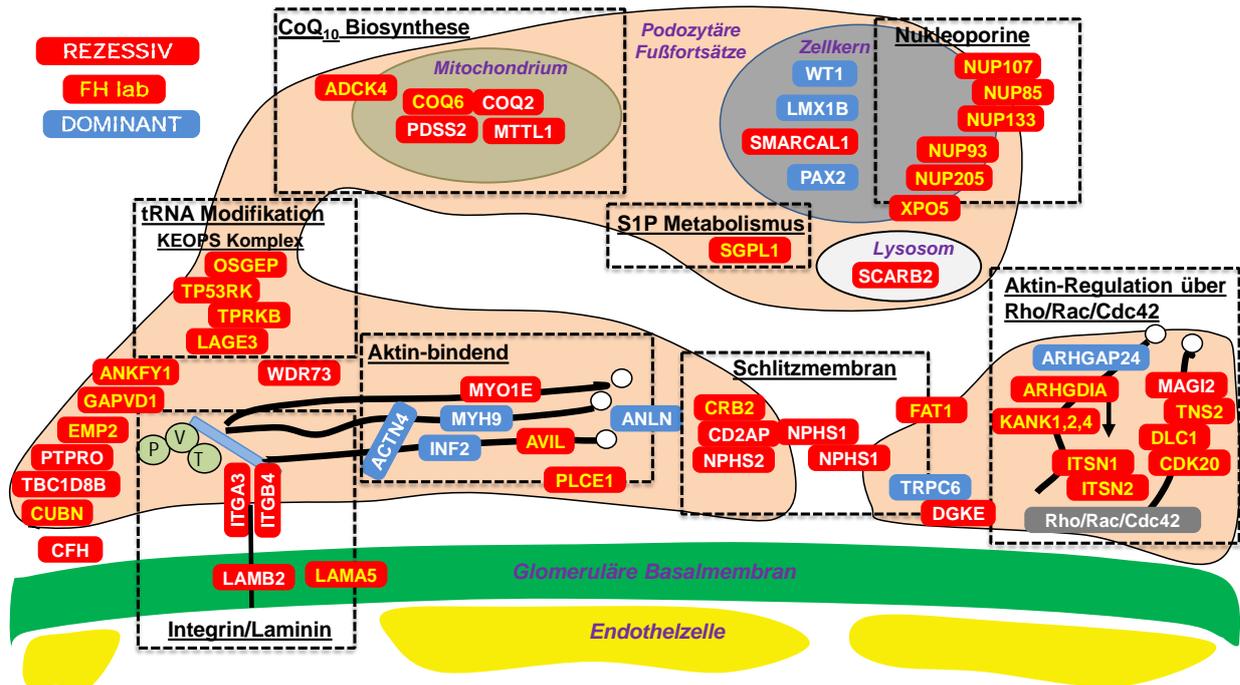


Abbildung 6: Monogenetische Ursachen des steroid - resistenten nephrotischen Syndroms (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Hildebrandt, modifiziert).

Schematische und vereinfachte Darstellung der Interaktion zwischen zwei Podozyten mit Kontakt zur glomerulären Basalmembran. Proteine, die eine rezessive monogenetische Form von SRNS auslösen wurden mit rotem Hintergrund dargestellt. Auf blauen Hintergrund dagegen wurden Proteine eingezeichnet, die eine dominante Form von SRNS generieren. Viele der SRNS auslösenden Gene interagieren miteinander über Protein-Protein Interaktion, stellen für die Funktion des Podozyten essenzielle Signalwege dar oder sind Bestandteile von strukturellen Komponenten der Zelle (schwarze Rahmen). In Tabelle 1 sind die dargestellten Gene mit Vererbungsmuster und klinischem Bild genauer beschrieben.

Tabelle 1: Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom auslösende Gene

Gen	Protein	Klinisches Bild	Vererbung	Referenz
Proteine der Schlitzmembran				
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	FSGS	AR	(Löwik et al., 2007)
<i>CRB2</i>	Crumbs family member 2	SRNS im Kindesalter	AR	(Ebarasi et al., 2015)
<i>FAT1</i>	FAT tumor suppressor homolog 1	SRNS, tubuläre Ektasie, Mikrohämaturie	AR	(Gee et al., 2016)
<i>KIRREL</i>	Kin of IRRE-like protein 1, Neph1	SRNS	AR	(Solanki et al., 2019)
<i>NPHS1</i>	Nephrin	kongenitales SRNS	AR	(Kestilä et al., 1998)
<i>NPHS2</i>	Podocin	SRNS	AR	(Boute et al., 2000)
<i>TRPC6</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member	SRNS	AD	(Winn et al., 2005)
Nukleäre Transkriptionsfaktoren und Nukleoporine				

<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1-beta	Nail-Patella-Syndrom; FSGS	AD	(Philippe et al., 2008)
<i>NUP107</i>	Nucleoporin 107 kDa	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2018)
<i>NUP133</i>	Nucleoporin 133 kDa	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2018)
<i>NUP160</i>	Nucleoporin 160 kDa	SRNS	AR	(Braun et al., 2018)
<i>NUP205</i>	Nucleoporin 205 kDa	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2016)
<i>NUP85</i>	Nucleoporin 85 kDa	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2018)
<i>NUP93</i>	Nucleoporin 93 kDa	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2016)
<i>PAX2</i>	Paired box 2	FSGS im Erwachsenenalter	AD	(Vivante et al., 2019)
<i>SMARCAL1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	Schimke-immunoossäre Dysplasie	AR	(Boerkoel et al., 2002)
<i>WT1</i>	Wilms tumor protein 1	Denys-Drash Syndrom, DMS, Pseudohermaphroditismus, Wilmstumor	AD	(Jeanpierre et al., 1998)
<i>XPO5</i>	Exportin-5	SRNS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2016)
Proteine der Q10-Biosynthese				
<i>ADCK4</i>	AarF domain containing kinase 4	SRNS	AR	(Ashraf et al., 2013)
<i>COQ2</i>	Coenzyme Q2 4-hydroxybenzoate—Polyprenyltransferase	Early-onset SRNS, Mitochondriale Erkrankung	AR	(Diomedi-Camassei et al., 2007)
<i>COQ6</i>	Coenzyme Q6 monooxygenase	Early-onset SRNS, Taubheit	AR	(Heeringa et al., 2011)
<i>MTTL1</i>	Mitochondrially encoded tRNA leucine 1	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose, Schlaganfallartige Episoden (MELAS-Syndrom), FSGS	AR	(Rudnicki et al., 2016)
<i>PDSS2</i>	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	Leigh Syndrom	AR	(López et al., 2006)
Proteine des KEOPS-Komplexes				
<i>LAGE3</i>	L Antigen Family Member 3	Early-onset SRNS und Mikrozephalie (Galloway-Mowat Syndrom)	AR	(Braun et al., 2017)
<i>OSGEP</i>	Probable O-sialoglycoprotein endopeptidase	Early-onset SRNS und Mikrozephalie (Galloway-Mowat Syndrom)	AR	(Braun et al., 2017)
<i>TP53RK</i>	TP53-regulating kinase	Early-onset SRNS und Mikrozephalie (Galloway-Mowat Syndrom)	AR	(Braun et al., 2017)
<i>TPRKB</i>	TP53RK Binding Protein	Early-onset SRNS und Mikrozephalie (Galloway-Mowat Syndrom)	AR	(Braun et al., 2017)
Aktin-bindende Proteine				
<i>ACTN4</i>	Alpha-actinin-4	FSGS	AD	(Kaplan et al., 2000)
<i>ANLN</i>	Anillin	FSGS	AD	(Gbadegesin et al., 2014)
<i>AVIL</i>	Advillin	SRNS im Kindesalter	AR	(Rao et al., 2017)

<i>INF2</i>	Inverted formin-2	FSGS	AD	(Brown et al., 2010)
<i>MYH9</i>	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	Makrothrombozytopathie, Nephritis und Taubheit (Alports Syndrom)	AD	(Epstein et al., 1972)
<i>MYO1E</i>	Myosin-Ie	FSGS	AR	(Mele et al., 2011)
<i>PLCE1</i>	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1	SRNS im Kindesalter	AR	(Hinkes et al., 2006)
Aktin regulierende kleine GTPasen der Rho/Rac/Cdc42 Familie				
<i>ARHGAP24</i>	Rho GTPase-activating protein 24	FSGS	AD	(Akilesh et al., 2011)
<i>ARHGDI1</i>	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Kongenitales SRNS	AR	(Gee et al., 2013)
<i>CDK20</i>	Cyclin Dependent Kinase 20	pTSNS	AR	(Ashraf et al., 2018)
<i>DLC1</i>	DLC1 Rho GTPase Activating Protein	pTSNS, SRNS	AR	(Ashraf et al., 2018)
<i>ITSN1, 2</i>	Intersectin-1 und 2	Early-onset NS, MCNS, pTSNS	AR	(Ashraf et al., 2018)
<i>KANK 1,2,4</i>	KN Motif And Ankyrin Repeat Domains 1, 2 and 4	SSNS (KANK 1 und 2), SRNS (KANK 4)	AR	(Gee et al., 2015)
<i>MAGI2</i>	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 2	pTSNS	AR	(Ashraf et al., 2018)
<i>TNS2</i>	Tensin 2	pTSNS, SRNS	AR	(Ashraf et al., 2018)
Integrine und Laminine				
<i>ITGA3</i>	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	Kongenitales SRNS, interstitielle Lungenerkrankung	AR	(Nicolaou et al., 2012)
<i>ITGB4</i>	Integrin, beta 4	Epidermolysis bullosa, Pylorusatresie, FSGS	AR	(Kambham et al., 2000)
<i>LAMA5</i>	Laminin, alpha 5	NS im Kindesalter	AR	(Braun et al., 2019)
<i>LAMB2</i>	Laminin, beta 2	Kongenitales SRNS mit DMS und Mikrokorie (Pierson-Syndrom)	AR	(Zenker et al., 2004)
Andere				
<i>ANKFY1</i>	Ankyrin Repeat And FYVE Domain Containing 1	SRNS im Kindesalter	AR	(Hermle et al., 2018)
<i>CFH</i>	Complement Factor H	FSGS	AR	(Sethi et al., 2012)
<i>CUBN</i>	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Proteinurie	AR	(Ovunc et al., 2011)
<i>DGKE</i>	Diacylglycerol Kinase Epsilon	Hämolytisch-urämisches Syndrom, SRNS	AR	(Lemaire et al., 2013, Bierzynska et al., 2017)
<i>EMP2</i>	Epithelial membrane protein 2	SSNS, SRNS im Kindesalter	AR	(Gee et al., 2014)
<i>GAPVD1</i>	GTPase Activating Protein And VPS9 Domains 1	Early-onset NS	AR	(Hermle et al., 2018)
<i>SCARB2</i>	Lysosomal integral membrane protein type 2	Action Myoclonus und Renal Failure Syndrom (AMRF)	AR	(Dibbens et al., 2016)
<i>PTPRO</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase O	NS	AR	(Ozaltin et al., 2011)

<i>SGLP1</i>	Sphingosine-1-phosphate lyase	FSGS, Ichthyose, adrenale Insuffizienz	AR	(Lovric et al., 2017)
<i>TBC1D8B</i>	TBC1 Domain Family Member 8B	Early-onset SRNS	XR	(Kampf et al., 2019)
<i>WDR73</i>	WD Repeat Domain 73	Early-onset SRNS und Mikrozephalie (Galloway-Mowat Syndrom)	AR	(Colin et al., 2014)

Early-onset Beginn der Erkrankung im Alter von 3 Monaten bis 4 Jahren,

Kongenital Beginn der Erkrankung bei Geburt bis zum Alter von 3 Monaten

In **Abb. 6** ist schematisch das Zusammenspiel und die Lokalisation der SRNS auslösenden Gene im Podozyten dargestellt. Eine der am frühesten entdeckten Gruppe ist durch Schlitzmembranproteine charakterisiert. *NPHS2* (Podocin) und *NPHS1* (Nephrin) sind zwei der am häufigsten mutierten Gene in Patienten und Patientinnen mit SRNS (Trautmann et al., 2018), weitere Proteine der Schlitzmembran sind CD2AP, CRBS, FAT1, KIRREL und TRPC6 (Ebarasi et al., 2015, Gee et al., 2016, Löwik et al., 2007, Solanki et al., 2019, Winn et al., 2005). Ist die Integrität der Schlitzmembran gestört, wird damit ein Teil der glomerulären Filterfunktion und der Kommunikation der Podozyten eingeschränkt (Pollak et al., 2014, Kawachi and Fukusumi, 2020). Wie in Kapitel 1.1.2 schon erläutert, zeichnen sich die Fußfortsätze der Podozyten durch ein komplexes, vor allem auf Aktin basierendes Zytoskelett, aus (Pavenstädt et al., 2003). Dieses Gerüst der Zellen muss dem Filtrationsdruck standhalten, aber dennoch schnell und flexibel auf verändernde Einflüsse reagieren können (Perico et al., 2016). Dementsprechend wurden Mutationen in Aktin-bindenden Proteinen gefunden, dazu gehören ACTN4, ANLN, AVIL, INF2, MYH9, MYO1E und PLCE1 (Brown et al., 2010, Epstein et al., 1972, Gbadegesin et al., 2014, Hinkes et al., 2006, Kaplan et al., 2000, Mele et al., 2011, Rao et al., 2017). Ist der Auf- und Abbau des Aktin-Zytoskelett gestört, verliert die Zelle ihre Stabilität und ihre Fähigkeit, die vollständige Bedeckung der GBM zu gewährleisten (Lasagni et al., 2013).

Außerdem wurde gezeigt, dass eine Fehlfunktion der kleinen GTPasen der Rho/Rac/Cdc42 Familie zur Fehlregulation des Aktin-Zytoskeletts und folglich zu Fußfortsatzverlust und Proteinurie führen (Wang et al., 2012). Die bisher entdeckten GTPasen sind ARHGAP24, ARHGDIA, CDK20, DLC1, ITSN1 und 2, KANK 1,2 und 4, MAGI2 und TNS2 (Akilesh et al., 2011, Ashraf et al., 2018, Gee et al., 2013, Gee et al., 2015).

Essentiell ist die stabile Bindung des Podozyten an die glomeruläre Basalmembran, da er sonst droht über den Urin verloren zu gehen (Vogelmann et al., 2003). Ist die Verbindung durch Mutationen der Integrine (ITGA3, ITGB4) oder Laminine (LAMA5, LAMB2) gestört, entwickeln die Erkrankten das klinische Bild eines nephrotischen Syndroms (Braun et al., 2019, Kambham et al., 2000, Nicolaou et al., 2012, Zenker et al., 2004).

Transkriptionsfaktoren haben durch ihre Fähigkeit, die Transkription von Genen im Zellkern zu beeinflussen, Auswirkungen auf die Proteinexpression der Zelle. Mutationen in den Transkriptionsfaktoren WT1, LMX1B, SMARCAL1 und PAX2 stehen in Zusammenhang mit der Pathogenese des nephrotischen Syndroms (Boerkoel et al., 2002, Jeanpierre et al., 1998, Philippe et al., 2008, Vivante et al., 2019). Ebenso wurden Mutationen in den nukleären Proteinen NUP107, NUP133, NUP160, NUP205, NUP85, NUP93 und XPO5 gefunden (Braun et al., 2016, Braun et al., 2018). Diese Proteine gehören zum Kernporenkomplex in der Doppelmembranhülle des Zellkerns (Braun et al., 2016, Braun et al., 2018). Durch die Poren kann eine große Anzahl von Molekülen in und aus dem Zellkern transportiert werden.

Einige der gefundenen Gene verursachen neben dem SRNS auch noch weitere spezifische Symptome. Beispielsweise lösen Mutationen in Proteinen des KEOPs-Komplexes (LAGE3, OSGEP, TP53RK, TPRKB) das Galloway-Mowat Syndrom (GAMOS) aus (Braun et al., 2017). Zu den Symptomen des GAMOS gehören Early-onset NS, Mikrozephalie mit Gehirnanomalien und Entwicklungsverzögerungen (Braun et al., 2017). Zu den Funktionen des KEOPs-Komplexes gehört die Modifikation von tRNAs, welche zur korrekten Translation der Proteine nötig ist (Braun et al., 2017).

Eine weitere funktionelle Gruppe stellen die mitochondrialen Proteine der CoQ₁₀ (Coenzyme Q10) Biosynthese dar. Da die Mitochondrien durch ATP Generierung die Energieträger aller Zellen sind, hat eine Störung der Abläufe im Mitochondrium oft systemische Auswirkungen. Daher lösen viele Mutationen der Gene *ADCK4*, *COQ2*, *COQ6*, *MTTL1* und *PDSS2* neben SRNS auch weitere vielfältige Symptome aus (Ashraf et al., 2013, Diomedi-Camassei et al., 2007, Heeringa et al., 2011, López et al., 2006, Rudnicki et al., 2016).

1.2.5 *ADCK4* Mutationen verursachen steroid-resistentes nephrotisches Syndrom

Ashraf et al. haben homozygote Mutationen in *ADCK4* in Patienten und Patientinnen mit SRNS detektiert. Es wurden elf verschiedenen Mutationen in acht Familien identifiziert, fünf homozygote Mutationen und drei komplex heterozygote Mutationen (Ashraf et al., 2013). Das Erkrankungsalter rangiert von unter einem Jahr bis 21 Jahren, das mediane Erkrankungsalter beträgt 13 Jahre. Menschen mit *ADCK4* Mutationen entwickeln eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) bei steroid-resistentem nephrotischen Syndrom (SRNS) gelegentlich mit extrarenalen Symptomen (Ashraf et al., 2013). Weitere Studien von Patientenkohorten berichten ähnliche Daten, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 13-14 Jahren und die Patienten und Patientinnen zeigen einen renal betonten Phänotyp (Atmaca et al., 2017, Korkmaz et al., 2016). Zusammenfassend konnten aus den drei Studien 70 Erkrankte mit *ADCK4* Mutationen

zusammengetragen werden, von denen über 60 % zum Zeitpunkt der Datenaufnahme keine extrarenalen Symptome zeigten. Insgesamt wurden bei 16 Patienten und Patientinnen weitere Symptome neben der Nierenerkrankung angegeben, am häufigsten wurden neurologische Symptome wie Krampfanfälle, Intelligenzminderung und Verhaltensauffälligkeiten beobachtet (Ashraf et al., 2013, Atmaca et al., 2017, Korkmaz et al., 2016). Selten kam es zu kardiologischen, ophthalmologischen oder endokrinologischen Symptomen. Bei den restlichen Erkrankten konnten keine Daten diesbezüglich erhoben werden.

ADCK4 ist auf Chromosom 19 gelegen und besitzt 15 codierende Exone. *ADCK4* wird in Podozyten exprimiert und lokalisiert dort in den Mitochondrien, spezifischer an der inneren Membran der Mitochondrien, und an den Fußfortsätzen der kultivierten Podozyten, es ist daher sowohl im Zytosol als auch mitochondrial vorhanden (Ashraf et al., 2013, Vazquez Fonseca et al., 2018). Es ist als eines von vielen Proteinen an der Biosynthese des Elektronencarriers Coenzyme Q10 (CoQ₁₀) beteiligt (Poon et al., 1997). Es konnten verminderte Spiegel von CoQ₁₀ in kultivierten Fibroblasten und Lymphoblasten von Patienten und Patientinnen mit Mutationen im *ADCK4* Gen nachgewiesen werden (Ashraf et al., 2013). CoQ₁₀ ist ein im menschlichen Körper ubiquitär vorkommendes Protein, welches an der Elektronenübertragung in der Atmungskette in den Mitochondrien beteiligt ist und antioxidative Wirkungen zeigt (Ernster and Dallner, 1995).

1.3 Fragestellung

Wie beschrieben lösen Mutationen im *ADCK4* Gen ein steroid-resistentes nephrotisches Syndrom beim Menschen aus. Über die genaue Funktionsweise von *ADCK4*, die funktionellen und histologischen Krankheitsabläufe und die zellulären Interaktionen der *ADCK4* defizienten Podozyten mit z. B. anderen glomerulären Zellen im Krankheitsverlauf des chronisch-progredienten Nierenversagens ist allerdings bisher fast nichts bekannt. Dies ist im Gegensatz zum Menschen aber hervorragend im genetisch-bedingten, podozyten-spezifischen, *Adck4* defizienten Mausmodell mittels repetitiver Untersuchungszeitpunkte bis zum Versterben der Tiere möglich. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen des podozyten-spezifischen Knockouts des Gens *Adck4* unter kontrollierten Bedingungen in den Knockout Mäusen im Vergleich zu gesunden Wurfgeschwistern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

0,2 ml PCR Strip Tubes	Corning-Incorporated, Corning, NY, USA
1,5 ml Reaktionsgefäß steril	Corning-Fisher Scientific, Corning, NY, USA
1,5 ml Reaktionsgefäß braun	Eppendorf, Hauppauge, NY, USA
15 ml Falcon - Gefäß	Corning-Fisher Scientific, Corning, NY, USA
2k CCD Kamera	Advanced Microscopy Techniques, Woburn, MA USA
50 ml Falcon-Gefäß	Corning-Fisher Scientific, Corning, NY, USA
8-Kanal-Multipipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Abaxis VetScan Rotoren	Scil Animal Care Company, Viernheim, Deutschland
Abaxis VetScan VS2	Scil Animal Care Company, Viernheim, Deutschland
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Deckglässchen (22x22mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DynaMag-2 Magnet	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Eclipse Ni E Lichtmikroskop	Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA
ExpressCast Maxigel-Elektrophoresesystem	Galileo Bioscience, Cambridge, MA, USA
Feinwaage XS204	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Lanzetten 5mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Leica SP5x Laser Scanning Confocal Microscope	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microtainer Tubes w/Lithium Heparin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge 5424	Eppendorf, Hauppauge, NY, USA
Mini Mikrozentrifuge 6765	Corning-Incorporated, Corning, NY, USA
Novex™ XCell™ SureLock (Westernkammer)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Owl EasyCast B1 Minigel-Elektrophoresesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Parafilm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-96-Well Microplate	USA Scientific, Ocala, FL, USA
Petrischalen	Corning-Incorporated, Corning, NY, USA
Pipetten	Eppendorf, Hauppauge, NY, USA
Pipettenspitzen	Corning-Fisher Scientific, Corning, NY, USA
PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sorvall Legend XTR Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sterile Plastikschaale	Corning-Incorporated, Corning, NY, USA
Tecnai G2 Spirit BioTWIN	FEI Company, Hillsboro, OR, USA
Thermal printer paper	ABS Imaging Systems
ThermoMixer Kompakt	Eppendorf, Hauppauge, NY, USA
Tissue-Tek Cryomold 15mmx15mmx5mm	VWR, Radnor, PA, USA

Tissue-Tek O.C.T. Compound	SciGen, Singapur
Waage XA5002S	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA

2.1.2 Chemikalien

16 % Paraformaldehyde	Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Amresco, Solon, OH, USA
Bovine Serumalbumin (BSA)	Atlanta Biologicals, Flowery Branch, GA, United States
Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate (Na ₂ EDTA* ₂ H ₂ O)	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Donor Donkey Serum	Gemini Bio, West Sacramento, CA, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natirumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TrisBase	RPI, Mt. Prospect, IL, USA
TrisHCL(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen, Grand Island, NY, USA

2.1.3 Genotypisierung

DNA-Aufreinigung	
Alkaline lysis reagent pH 12	25 mM NaOH, 0,2 mM NA ₂ EDTA
Neutralization reagen pH 5	40 mM Tris-HCL

PCR	
HotStar Taq Master Mix (1000)	Qiagen Sciences Inc, Germantown, MD, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H ₂ O	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

PCR - Primer	Sequenz 5' → 3'
Adck4-forward	CTGACTTCCGTAGTTCAATTCTAT
Adck4-reverse	AATACTCCTGCCTCTGCTTC
Cre-Nphs1-specific	CTCCACCAAGACACAGCTGTC
Cre-internal-reverse	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

β -Globin forward	GCCTCACCACCAACTTCATC
β -Globin reverse	CGAAGCCTGATTCCGTAGAG

DNA - Gelelektrophorese	
Agarosegel 2,0 %	2 g Agarose, 100 ml TBE-Puffer, 0,05 μ l/ml Ethidiumbromid
TBE-Puffer (10 x Stock)	1l H ₂ O = 108 g Tris-Base + 55 g Borsäure + 0,5 mM EDTA
TBE-Puffer	1x TBE tris/Borate/EDTA
6x Ladepuffer-DAPI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
1000 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.1.4 Isolation der Maus-Glomeruli

Puffer, Lösungen, Beads	
Dynabeads M-450	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
HBSS (Hanks Buffered Salt Solution)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kollagenase-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cell strainer (100 μ m)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lysepuffer: RIPA lysis buffer, Halt Protease-Inhibitor, Halt Phosphatase- Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

2.1.5 SDS-PAGE und Immunoblot

Polyacrylamidgelzusammensetzung	
NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Puffer	
Laufpuffer: NuPAGE MES SDS (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waschpuffer: TRIS-Buffered Saline (TBS, 10x)	Boston Bioproducts, Boston, MA, USA
BSA-Absättigungspuffer: SuperBlock T20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Primär - Antikörper	
Anti-ADCK4 (NBPI-85508) Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (1:1000)	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
Anti- β -Aktin (ab20272)	Abcam, Cambridge, UK

Monoklonaler Maus-Antikörper (1:10000)	
--	--

Sekundär-Antikörper	
Anti-rabbit IgG (#7074) HRP-linked Antikörper (1:10000)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Enhanced Chemolumineszenz Reagenz	
SuperSignal™ West Pico Maximum Sensitivity Substrate	VWR, Radnor, PA, USA
SuperSignal™ West Femto Extended Duration Substrate	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SuperSignal™ West Dura Chemiluminescent Substrate	VWR, Radnor, PA, USA

2.1.6 Immunfluoreszenzfärbung

Lösungen	
Waschpuffer	PB-Stammlösung
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd in PB-Stammlösung
Absättigungslösung	PBS, 10 % donkey serum, 1 % bovine Serumalbumin (BSA)

Primär - Antikörper	
Anti-aSMA (#19245) Monoklonaler Kaninchen-Antikörper (1:100)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Nephrin (GP-N2) Polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper (1:50)	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
Anti-Nidogen (NBP1-97701) Monoklonaler Ratten-Antikörper (1:150)	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
Anti-Podocin (P0372) Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (1:100)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-WT1 (#83535) Monoklonaler Kaninchen-Antikörper (1:100)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Sekundär - Antikörper bzw. Kernfärbung	
Alexa Fluor 488 (A-11073) Ziege-anti-Meerschweinchen (1:500)	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Alexa Fluor 594 (A-11037) Ziege-anti-Kaninchen (1:500)	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
Alexa Fluor 488 (A-11006)	Invitrogen, Grand Island, NY, USA

Ziege-anti-Ratte (1:500)	
Hoechst 33342 - Kernfärbung (1:1000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Sonstiges	
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
ProLong Diamond Antifade Mountant	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.1.7 Gewebefixation

Nierenfixation	
PB-Stammlösung	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fixationslösung Transmissionselektronenmikroskopie	5 % Glutaraldehyd in PB-Stammlösung
Fixationslösung Histologie	4 % Paraformaldehyd in PB-Stammlösung

Transmissionselektronenmikroskopie	
Fixationslösungen	2,5 % Glutaraldehyd, 1,25 % Paraformaldehyd, 0,03 % Picrinsäure in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer; Osmiumtetroxid/ 1,5 % Kaliumferricyanid; 1 % Uranylacetat in Maleate Puffer
Waschlösungen	50 mM Maleate Puffer (pH 5,15); Natriumcacodylat Puffer (pH 7,4)
Einbettungslösungen	Propylenoxid; TAAB Epon

2.1.8 Messung von Albumin, Kreatinin, Harnstoff und Phosphat

Urin- und Serumanalyse	
Abaxis VetScan VS2: Vollblutanalyse	Scil Animal Care Company, Viernheim, Deutschland
LC-MS/MS: Kreatinin Urin- und Serumanalyse	The O'Brien Center and UAB Biochemical Genetics
Albumin Blue Fluorescent Assay Kit	Active Motif, Carlsbad, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Mausstämme

Zur in vivo Untersuchung der Rolle von ADCK4 in Podozyten wurden podozytenspezifische *Adck4*-Knockout Mäuse (*Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* bzw. *Adck4^{APodozyt}*) generiert. Dieser Mausstamm wurde aus den embryonalen Stammzellen des European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) durch die Core-Facility von Ann Arbor-Michigan University und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Friedhelm Hildebrandt kreiert. Dieses Modell wurde gewählt, da der konstitutive Knockout von *Adck4* (*Adck4^{tm1b}* von EUCOMM, **Abb. 7 (2)**) sich als embryonal lethal (E 9.5) (International Mouse Phenotyping Consortium, 2021) erwies. Um einen podozytenspezifischen Knockout des Gens zu erzielen, wurde das Cre/loxP Rekombinasesystem verwendet (Sauer, 1998). Dafür wurden *Adck4^{lox/flox}* (*Adck4^{tm1c}*) Mäuse, bei denen die Exons 5 und 6 von loxP-Sequenzen umschlossen sind, (**Abb. 7 (3)**) mit Podocin-Cre⁺ Mäusen gekreuzt, welche freundlicherweise von Dr. Holzmann (University of Pennsylvania) zur Verfügung gestellt wurden. Die Cre-Rekombinase, die durch den podozytenspezifischen Promotor für Podocin (*Nphs2.Cre⁺*) reguliert wird (Moeller et al., 2002), induziert exklusiv in den Podozyten die Entfernung des von loxP-Sequenzen umschlossenen Teil des Gens (**Abb. 7 (4)**). Daher kommt es nur in den Podozyten zu einem Funktionsverlust von *Adck4*.

1) Wild type allele

2) EUCOMM *Adck4*^{tm1a(EUCOMM)Hmgu} allele, constitutive knock-out3) EUCOMM *Adck4*^{tm1c(EUCOMM)Hmgu} Flp recombined allele4) EUCOMM *Adck4*^{tm1d(EUCOMM)Hmgu} Cre recombined allele

Abbildung 7: Schematische Darstellung der in den *Adck4* wildtype Locus (1) eingefügten synthetischen Kasette (2) (Darstellung von Widmeier et al., 2020).

Mithilfe von Flp/FRT Technologie und Verwendung des Cre/loxP Systems wurde aus dem Allelkonstrukt (2) ein konditioneller Knockout von *Adck4* generiert. Dafür wurde das Genom der Tiere so manipuliert, dass die Exons 5 und 6 des Gens von zwei loxP-Sites umschlossen sind (3). Der Zell-spezifische Knockout des Gens erfolgte durch die Cre-Rekombinase aktivierte Entfernung des geflochten Teils (4). Die Exons wurden nummeriert.

Die Versuchstiere waren unter pathogenfreien Bedingungen zu maximal fünf Tieren in Käfigen untergebracht. Um einen regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere sicherzustellen, wurden die Lichter um 7:00 Uhr eingeschaltet und waren ab 19:00 Uhr ausgeschaltet. Unlimitierter Zugang zu Wasser und Futter wurde gewährleistet.

Alle Protokolle der Tierversuche waren im Vorhinein von der Institutional Animal Care and Use Committee of Boston Children's Hospital geprüft und genehmigt worden. Die Mäuse wurden entsprechend der Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals gehalten.

2.2.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde aus den Mäuseschwanzspitzen Gewebe gewonnen, die DNA des Gewebes wurde gereinigt und mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) analysiert.

2.2.2.1 DNA-Aufreinigung

Das gewonnene Gewebe wurde in ein 150 µl Eppendorfgefäß überführt und für einige Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden dem Gewebe 75 µl eines alkalischen Reagenz (pH 12) zugefügt. Durch zehn Sekunden langes Vortexen und Zentrifugation bei 10.000 rpm für eine Minute wurde sichergestellt, dass das Gewebe vollständig von dem alkalischen Reagenz umhüllt ist. Anschließend ließ man die Eppendorfgefäße für 30 Minuten bei 95 °C in einem Heizblock inkubieren. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Gefäße bei 10.000 rpm für eine Minute und daraufhin die Abkühlung auf Raumtemperatur. Es erfolgte die Zugabe eines neutralisierenden Reagenzes (pH 5) mit anschließendem zehn-sekündigem Vortexen und Zentrifugation bei 10.000 rpm. Die Aufbewahrung der DNA der Versuchstiere erfolgte bei 4 °C.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wird allgemein dafür eingesetzt, um eine durch spezifische Primer definierte DNA-Sequenz in vitro exponentiell zu amplifizieren (Saiki et al., 1985). Die Technik wurde verwendet, um zwischen Mäusen mit *Adck4*-Mutationen und Wildtypieren unterscheiden zu können. Die PCR Methode besteht aus einer Wiederholung von Zyklen, welche wie folgt ablaufen. Als erstes geschieht die Auftrennung der DNA-Stränge (Denaturierung) durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95°C. Im zweiten Schritt lagern sich die spezifischen Primer an die passenden DNA-Sequenzen an (Annealing). Die gewählte Annealingtemperatur (x °C) ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der verwendeten Primer (Lorenz, 2012). Die Elongationsphase dient der Synthese der komplementären DNA-Sequenzen durch die DNA-Polymerase, mehrere Zyklen sorgen für eine exponentielle Vermehrung der als Ziel gesetzten DNA-Sequenz. Diese Phase ist abhängig von der Länge der zu erwartenden DNA-Sequenzen (1 Min. pro 1kb PCR-Produkt). Nach dem letzten Zyklus wird die Elongationsphase um zehn Min verlängert, damit noch einzelsträngige DNA vervollständigt werden kann. Alle PCR-Reaktionen liefen in einem Thermocycler ab.

Allgemeine Reaktionsbedingungen:

Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung der DNA-Doppelstränge vor dem ersten Zyklus	95 °C	15 Min.	1x
Denaturierung	94 °C	30 Sek.	36x
Annealing (Anlagerung der Primer)	x °C	30 Sek.	
Elongation (Taq-Polymerase)	72 °C	1 Min./kb	
Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 Min.	1x
Lagerung	4 °C	∞	1x

PCR-Reaktionsansätze:

<i>Adck4</i> PCR-Reaktionsansatz 9 µl	
HST Taq Mix	5 µl
<i>Adck4</i> -Primer-forward (1:20 verdünnt)	0,25 µl
<i>Adck4</i> -Primer-reverse (1:20 verdünnt)	0,25 µl
H ₂ O	2,5 µl
DNA	1 µl

NPHS1 Cre PCR-Reaktionsansatz 10 µl	
HST Taq Mix	5 µl
Cre-NPHS1specific-Primer-forward (1:20 verdünnt)	0,5 µl
Cre-internal-Primer-reverse (1:20 verdünnt)	0,5 µl
β-Globin-Primer-forward (1: 20 verdünnt)	0,1 µl
β-Globin-Primer-reverser (1:20 verdünnt)	0,1 µl
DMSO	0,1 µl
H ₂ O	2,7 µl
DNA	1 µl

2.2.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Analyse der amplifizierten PCR erfolgte durch Gelelektrophorese. Für die Auftrennung der Proben wanderte die DNA 90 Min. bei 150 V durch ein Agarosegel. Für die Herstellung des 2%igen Gels wurde Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Das zugefügte Ethidiumbromid lagert sich an die DNA an und kann mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden (Aaij and Borst, 1972).

2.2.3 Herstellung der Glomeruli-Lysate

Um nachzuweisen, dass die Proteinexpression von *Adck4* in den Podozyten der Knockout Mäuse tatsächlich reduziert war, mussten die Glomeruli vom restlichen Nierengewebe isoliert werden. Die gewählte Methode beinhaltete die Nutzung von magnetischen Dynabeads (Takemoto et al., 2002), welche mit einem Durchmesser von 4,5 µm die richtige Größe besaßen, um die Glomeruluskapillaren zu embolisieren. Für die Herstellung der Glomeruli-Lysate wurden den Mäusen die Nieren im Paket entnommen und in 10 cm-Durchmesser große Petrischalen mit

gekühltem PBS gegeben. In der Vorbereitung wurden die Dynabeads drei Mal mit 1 ml HBSS gewaschen und schließlich in 10 ml HBSS resuspendiert. Über die Arterie renalis wurden die Mäusenieren langsam mit jeweils 1 ml Beads-Lösung pro Niere perfundiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach Entfernung der Gefäße und der Nierenkapsel wurden die perfundierten Nieren mithilfe eines Skalpell in 1 mm^3 kleine Stücke zerteilt. Hiernach wurden die Gewebestücke in eine Petrischale mit 3,5 cm Durchmesser transferiert und mit 2,5 ml DNase/Kollagenase-Lösung für 30 Min. bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ leicht rüttelnd inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das verdaute Nierengewebe durch ein $100 \text{ }\mu\text{m}$ Zellsieb in einen 50 ml großen Falcon überführt. Mittels eines kleinen Stempels wurde das Gewebe durch das Sieb gepresst, anschließende Spülung mit 5 ml HBSS. Dieser Schritt wurde mit einem neuen Zellsieb wiederholt, diesmal ohne zusätzlichen Druck durch den Stempel. Anschließende Spülung mit 10 ml HBSS. Die Gewebesuspension wurde bei 1000 rpm für fünf Min. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Resuspension mit 3 ml HBSS und Überführung des gelösten Nierengewebes in jeweils zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße. Die Trennung der Glomeruli mit enthaltenen Dynabeads von den restlichen Nierenzellen erfolgte mithilfe eines Magneten. Nach mehrfachem Waschen mit HBSS und Zusammenführung der Glomerulisuspensionen in ein gemeinsames Eppendorfgefäß wurden die isolierten Glomeruli in flüssigem Stickstoff gefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Herstellung der Glomeruli-Lysate wurden die vorher isolierten Mausglomeruli in $60 \text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer resuspendiert. Die Gewebelysate wurden für drei Min. mit einem Mörser bearbeitet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Prozedur wurde drei Mal wiederholt mit dem Ziel, die Lysewirkung zu verstärken. Es folgte die Inkubation der Glomeruli-Lysate für 30 Min. auf Eis. Anschließend wurden sie für 45 Min. bei 1500 rpm bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand enthält die gelösten Proteine und wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Abschließend folgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Glomeruli-Lysate mittels eines Proteinkonzentrationsstests von BioRad.

In Vorbereitung wurden Reagent S und Reagent A im Verhältnis 1:50 miteinander zum Working Reagent A' vermischt. Standard Proteinproben von 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 und 0 mg/ml wurden im gleichen Lysepuffer wie die Glomeruli-Lysate angesetzt. Für die Messung der Proteinkonzentrationen wurde eine schwarze Mikrotiterplatte verwendet und alle Proben wurden in doppelter Ausführung pipettiert. Pro Vertiefung wurden $5 \text{ }\mu\text{l}$ Proteinlysate oder Standard mit $25 \text{ }\mu\text{l}$ Working Reagent A' zusammengegeben. Anschließend wurden $200 \text{ }\mu\text{l}$ Reagent B zu jeder Vertiefung pipettiert, vermischt und für 15 Min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auslesung der Konzentrationen erfolgte in einem konventionellen Spektrofluorometer.

Emissionswellenlänge	750 nm
Wellenlänge	9 nm
Number of flashes	25
Automix	10s
Auslesungen	10
Temperatur	25 °C

Für die Auswertung wurde eine Standardkurve aus den log-Werten der Standards und deren Durchschnittsemissionswerten berechnet. Diese Funktion diente als Grundlage zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der Glomeruli-Lysate.

2.2.4. SDS-PAGE und Immunoblot (Western Blot)

Durch die Western Blot Methode werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und können dort durch spezifisch bindende Antikörper sichtbar gemacht werden. Ebenso gelingt durch diese Methode eine Quantifizierung der nachgewiesenen Proteine mithilfe einer Reihe von Proteinstandards (Towbin et al., 1979).

Die Beladung des Polyacrylamidgels erfolgte mit jeweils 50 µg Protein der Glomeruli-Lysate (siehe Kapitel 2.2.3) gelöst in 15 µl Lysepuffer und versetzt mit 5 µl Loading-Detergent. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit Proteinstandard gefüllt. Das beladene Gel lief in einer Western Blot-Kammer bei 120 V für 100 Min. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte durch das iBlot 2 Dry Blotting System von Invitrogen innerhalb von sieben Minuten. Ein Schnelltest des erfolgreichen Western Blots wurde mittels Ponceau Färbung durchgeführt. Nach dem Test folgte dreimaliges Waschen der Membran für drei Minuten. Anschließend wurde die Membran in Superblock (Invitrogen) entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C gelagert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu besetzen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (angesetzt in Superblock) fand über Nacht bei 4 °C statt. Durch dreimaliges Waschen für fünf Min. wurden die ungebunden Primärantikörper entfernt. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur für 45 Min. inkubiert, dieser bindet spezifisch an den Primärantikörper. Die Reste des Sekundärantikörpers wurden durch dreimaliges Waschen à fünf Min. entfernt. Die Proteinbanden wurden mittels entsprechend starker Chemilumineszenz Substrate und dem Gel Doc XR+System (BioRad) von Invitrogen detektiert. Die auf die Membran gegebenen Chemilumineszenz Substrate erkennen die Meerrettichperoxidase der Sekundärantikörper.

Für die Ladungskontrolle wurde die Membran für 30 Min. bei Raumtemperatur mit einem β-Aktin-Antikörper inkubiert und dreimal für fünf Min. gewaschen. Abschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers bei Raumtemperatur für ebenfalls 30 Minuten. Die Auswertung der β-

Aktin Banden wurde mittels des SuperSignal™ West Dura Chemiluminescent Substrate durchgeführt.

2.2.5 Histologie*

*Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit dem Department of Pathology, Boston Children's Hospital durchgeführt.

Um das Nierengewebe der Mäuse auf glomeruläre Veränderungen zu untersuchen, wurden Hematoxylin-Eosin (HE), Perjodsäure-Schiff (PAS), Masson-Trichrome Färbungen und Silberfärbung nach Jones durchgeführt. Dafür wurde den Mäusen postmortem das Nierengewebe entnommen und in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für einen Tag fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung des Gewebes in Paraffin. Die histologische Gewebeaufbereitung erfolgte durch das Department of Pathology, Boston Children's Hospital. Das Gewebe wurde in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Abschließend wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gegeben. Daraufhin folgte die Durchführung der entsprechenden Färbungen nach Standardprotokollen.

Die Auswertung der histologischen Färbungen des Nierengewebes erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie*

*Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit der Electron Microscope Core Facility, Harvard Medical School durchgeführt.

Die Transmissionselektronenmikroskopie eignet sich zur zweidimensionalen Untersuchung der Mikromorphologie der Podozyten auf mögliche Veränderungen. Die entnommenen Nieren der Mäuse wurden halbiert und über Nacht bei 4 °C in 2,5 % Glutaraldehyd, 1,24 % Paraformaldehyd und 0,03 % Picrinsäure in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer fixiert. Danach wurden die Mäusenieren in 1-2 mm große Stücke zerteilt und noch einmal für zwei Stunden in oben genannter Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer gewaschen und in 1 % Osmiumtetroxid/ 1,5 % Kaliumferricyanid über eine Stunde fixiert. Nachfolgende Waschungen der Präparate bestanden aus zweimal Wasser und einmal 50 mM Maleat-Puffer (MP, pH 5,15). Die Nieren wurden hiernach in 1 % Uranylacetat in MP für eine Stunde inkubiert, gefolgt von einer Waschung in MP und zwei Waschungen mit Wasser. Anschließend erfolgt die Dehydratation der Präparate in ansteigenden Konzentrationen von Ethanol (50 %, 70 %, 90 %, 2x 100 %) für jeweils zehn Minuten. Die Proben wurden in Propylenoxid für eine Stunde inkubiert, danach in einer 1:1 Mixtur aus Propylenoxid und TAAB 812 (Epon) über Nacht bei 4 °C

aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Nierenstücke in TAAB 812 eingebettet und bei 60 °C für 48 Stunden polymerisiert. Mithilfe des Reichert Ultracut-S Microtome wurden die Proben 80 nm dünne Scheiben geschnitten und auf mit Bleicitrat gebeizte Kupfergitter transferiert. Die morphologische Analyse der podozytären Ultrastruktur erfolgte anschließend am TecnaiG² Transmissionselektronenmikroskop. Alle Bilder wurden mit einer AMT 2k CCD Kamera (Originalbilder) aufgenommen.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz wird verwendet, um die Expression von Proteinen in Zellen sichtbar zu machen (Coons, 1961). Dafür werden spezifische, an die zu untersuchenden Proteine bindende, Primärantikörper mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern gekoppelt (Nakane and Pierce, 1966).

Den Mäusen wurden die Nieren entnommen und in eine mit O.C.T. Einbettungsmedium gefüllte Einbettungsform gegeben. Diese wurde auf einen in flüssigen Stickstoff stehenden Metallblock gelegt, sodass die Nierenproben langsam und gleichmäßig gefroren. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -80 °C. Zur Analyse der Proben wurden die Nieren in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 10 % Esel-Serum und 1 % BSA in PBS für 90 Min. geblockt. Dadurch werden die unspezifischen Bindungsstellen für die primären Antikörper reduziert. Hiernach wurden die Proben dreimal für fünf Min. gewaschen. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrmals mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden für 45 Min. bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit ProLong Diamond Antifade eingedeckelt. Ein konfokales Lasermikroskop wurde benutzt, um die Proteinexpression der Podozyten zu untersuchen. Für die Auswertung der Bilder wurden die Programme Leica AF und Adobe Photoshop CS5 eingesetzt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden in 10 % Esel-Serum und 1 % BSA in PBS angesetzt und in unterschiedlichen Verdünnungen angewandt.

2.2.8 Quantitative Assays

2.2.8.1 Albumin-Test

Eine erhöhte Albuminausscheidung ist als pathologisch anzusehen und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Folge einer glomerulären Schädigung der Nieren. Um die

Albuminkonzentration im Urin der Versuchstiere zu messen, wurde das Albumin Blue Fluorescent Assay Kit der Firma Active Motif verwendet. Diese Testmethode beruht auf der spezifischen Bindung des Reagenz an das sich im Urin befindende Albumin. Diese Verbindung lässt sich in einem Bereich von 540-580 nm anregen und emittiert darauf im Bereich 600-640 nm eine Fluoreszenz. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Konzentration des Albumins in der Probe. Die Gewinnung des Urins erfolgte in metabolischen Käfigen, in denen die Mäuse separat über Nacht für zwölf Stunden untergebracht waren. Der Urin wurde getrennt von Kot in 50 ml Falcons aufgefangen, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit Identifikationsnummer und Datum beschriftet. Die Aufbewahrung bis zur Analyse erfolgte bei -80 °C. In Vorbereitung zur Untersuchung der Albuminkonzentration wurden die Proben auf Eis aufgetaut, gevortext und für drei Min. bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden entsprechend der Bedingungen mit Buffer B verdünnt. Zur Vorbereitung der Reagenzien wurde das Dye Reagent in 1 ml Isopropanol resuspendiert und anschließend im Verhältnis von 1:50 mit Buffer A zur Dye Reagent Working Solution verdünnt. Eine Mausalbuminstandardlösung wurde in Buffer B hergestellt. Jeweils 25 µl einer Mausalbumin-Standardreihe von 250, 125, 100, 50, 25, 12,5, 10 und 0 mg/l und der Mäuseurinverdünnungen wurden lichtgeschützt in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert. Alle Proben wurden doppelt angesetzt. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 150 µl Dye Reagent Working Solution versetzt. Es folgte die lichtgeschützte Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung der Fluoreszenz wurde in einem Nanoquant durchgeführt.

Anregungswellenlänge	560 nm
Emissionswellenlänge	620 nm
Automix	10 s
Auslesungen	10
Temperatur	25 °C

Für die Auswertung wurde eine Standardkurve aus den log-Werten der Standards und deren Durchschnittsemissionswerten berechnet. Diese Funktion diente als Grundlage zur Berechnung der Albuminkonzentrationen der Mäuseurine.

2.2.8.2 Kreatinin-Test (Urin)*

*Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit UAB Biochemical Genetic durchgeführt.

Kreatinin ist ein Produkt des Muskelstoffwechsels, es entsteht beim Abbau der Säure Kreatin. Die endogen entstehende Menge ist definierbar pro 24 Stunden, aber abhängig von der Muskelmasse. Physiologisch wird Kreatinin hauptsächlich glomerulär filtriert und kaum tubulär sezerniert, es eignet sich daher gut als Parameter zur Beurteilung der glomerulären Filtrationsleistung

(Silbernagel and Despopoulos, 2012: 160). Dabei steigt die Kreatininkonzentration im Serum erst ab einer Abschwächung der GFR um 50 % an. Die Bestimmung des Kreatinins eignet sich daher nicht zur Früherkennung einer Nierenschädigung, sondern als Verlaufskontrolle von Nephropathien.

Die Messung von Kreatinin im Urin dient als Bezugsgröße für die Albuminausscheidung (Lambers Heerspink et al., 2010). Zur Bestimmung der Konzentration des Kreatinins im Urin wurde die Methode der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) verwendet. Dafür wurden 10 µl Urin pro Maus pro Monat an UAB Biochemical Genetic geschickt, die freundlicherweise die LC-MS/MS Messungen durchführten.

2.2.8.3 Kreatinin-Test (Serum)*

*Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit University of Alabama at Birmingham/University of California at San Diego O'Brien Core Center for AKI Research.

Für die Messung von Kreatinin im Serum wurde den Versuchstieren ab einem Alter von drei Monaten monatlich Blut abgenommen. Da für die verschiedenen Messungen von Serumparametern eine Menge von ca. 200 µl Blut pro Maus benötigt wurde, ist die Blutabnahme aus den facialem Venen eine geeignete Methode. Diese Vorgehensweise lässt sich ohne Anästhesie der Tiere durchführen und wird von den Mäusen gut toleriert (Francisco et al., 2015). Die Mäuse wurden durch die den Versuch durchführende Person in der Hand so fixiert, dass der Kopf überstreckt und das seitliche Halsdreieck gut sichtbar ist (Parasuraman et al., 2010). An der hinteren Kante des Kiefers fließen die facialem Venen zum Plexus zusammen, dort befindet sich der optimale Punkt zum Blutabnehmen (Golde et al., 2005). Mit einer 5 mm Lanzette wurde die Vene angestochen und das Blut in ein mit Heparin beschichtetes Gefäß aufgefangen. Die Blutmenge sollte max. 700 µl betragen, da diese Menge an Blut von den Mäusen innerhalb von 24 Stunden ersetzt werden kann (Golde et al., 2005). Nach der Blutabnahme wurde die Einstichstelle mit steriler Gaze sofort abgedrückt und in weniger als einer Minute sistierte die Blutung. Um das Serum zu gewinnen wurde das Blut bei 5600 rpm für zehn Min. zentrifugiert. Der Überstand ohne die Zellbestandteile des Blutes wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und erneut bei 5600 rpm für zehn Min. zentrifugiert. Der Überstand stellte das Serum dar und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Konzentration des Serumkreatinins wurde die Methode der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) verwendet.

Dafür wurden 5 µl Serum pro Maus pro Messpunkt an UAB O'Brien Core Center for AKI Research geschickt, die freundlicherweise die LC-MS/MS Messungen durchführten.

2.2.8.4 Messung von Albumin, Harnstoff und Phosphat im Vollblut

Wichtige Parameter im Blut, die auf ein Nierenversagen hindeuten, sind ein verringertes Albumin und steigende Harnstoff- und Phosphatwerte. Durch die vermehrte Ausscheidung von Albumin durch eine Schädigung des glomerulären Filtersystems, lässt sich folglich eine verminderte Konzentration von Albumin im Serum nachweisen. Harnstoff ist neben Kreatinin ein klassischer Nierenretentionsparameter, welcher zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen wird. Phosphat ist vor allem ein Marker der fortgeschrittenen Niereninsuffizienz. Die Harnstoff- und Phosphatwerte steigen im Verlauf einer chronischen Nierenerkrankungen durch verminderte renale Elimination an (Macedo et al., 2015: 852).

Für die Messung von Albumin, Harnstoff und Phosphat wurde Vollblut verwendet. Die antikoagulierten Blutproben der Versuchstiere wurden innerhalb von ein bis zwei Stunden nach Abnahme durch den VetScan VS2 ausgewertet. Dafür wurden 100 µl Blut pro Maus in den vorgegebenen Reagenzienrotor pipettiert und anschließend vom Gerät analysiert.

2.2.9 Datenanalytik

Die Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 5.0. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler in Form von miteinander verbundenen Punkten dargestellt. Der zweiseitige t-Test diente zur Überprüfung der Signifikanz, dabei wurden Werte $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Die Kaplan-Meier-Kurve wurde mittels Logranktests untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Der *Adck4*-Knockout in Podozyten führte zu einer progredienten Niereninsuffizienz mit glomerulärer Proteinurie.

3.1.1 Nachweis des *Adck4*-Knockouts der Mäuse

Um den Effekt eines *Adck4* Mangels in vivo zu untersuchen, wurden podozytenspezifische *Adck4*-Knockout Mäuse (*Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}*) gezüchtet. Wie in Kapitel 2.1.1 erläutert, wurden *Nphs2.Cre⁺* Mäuse mit *Adck4^{lox/flox}* Mäusen gekreuzt. Daher lässt sich in *Adck4*-Knockout Mäusen in beiden Allelen loxP-sites und *Nphs2.Cre⁺* (**Abb. 8A**) nachweisen.

Für die Studie wurden heterozygote *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{wt/flox}* miteinander verpaart. Der Genotyp des neugeborenen Mäusenachwuchses wurde für jede einzelne Maus mittels PCR aus Maus-DNA bestimmt (**Abb. 8A**). Anhand der Ergebnisse wurden die neugeborenen Tiere randomisiert in die zwei Gruppen *Adck4*-Knockout und Kontrollen eingeteilt. Die regelmäßige klinische Untersuchung der Mäuse begann ab dem dritten Lebensmonat. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Mäuse ab drei Monaten groß genug waren um den Blutverlust von ca. 500 µl ohne gesundheitliche Risiken zu überstehen. Monatlich wurden die Mäuse gewogen, es wurde ihr Urin über Nacht gesammelt und untersucht, sowie eine Blutuntersuchung durchgeführt. Täglich wurde das Wohlbefinden der Mäuse kontrolliert.

Die Analyse mittels Western Blot bestätigte die ausgeprägte Reduktion der Proteinexpression von *Adck4* in den glomerulären Lysaten der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (**Abb. 8B**). Damit ist der Nachweis des podozytenspezifischen Knockouts von *Adck4* in den Versuchstieren gelungen. Die verbliebene, schwache Bande von *Adck4* in der Western Blot-Analyse von Knockout Mäusen lässt sich dadurch erklären, dass das Glomeruli-Lysat kein reines Podozyten-Lysat ist und durch *Adck4*-Expression anderer glomerulärer Zellen verunreinigt wird.

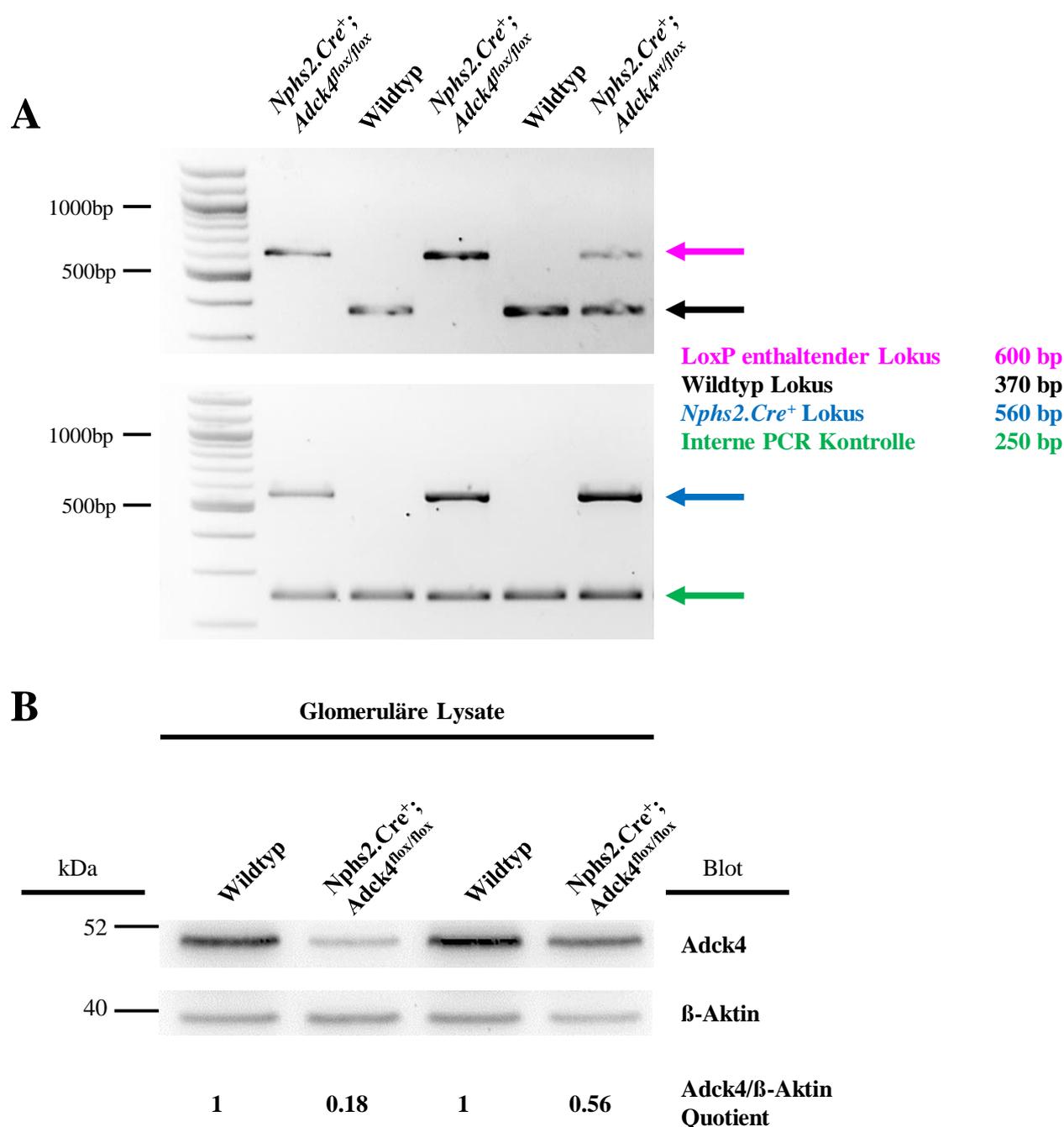


Abbildung 8: Nachweis des podozyten spezifischen Knockouts von *Adck4* in Mäusen mittels PCR aus DNA und Western Blot.

(A) Darstellung der PCR Produkte aus Mäuseschwanzspitzen. Im oberen Feld wurden für den Nachweis des loxP Allels spezifische Primer verwendet, die für das Wildtyp Allel eine Bande bei ca. 370 bp und für das loxP enthaltende Allel eine Bande bei ca. 600 bp generierten. Im unteren Feld wurden *Nphs2.Cre⁺* spezifische Primer genutzt, die bestätigende Bande verläuft bei ca. 560 bp. Die β-Globin Bande bei ca. 250 bp diente der internen Kontrolle.

(B) Die Analyse mittels Western Blot bestätigte die Reduktion der Proteinexpression von Adck4 in den glomerulären Lysaten der *Nphs2.Cre⁺;*Adck4^{flox/flox}** Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Bande für Adck4 verläuft bei ca. 50 kDa. β-Aktin diente der Ladungskontrolle.

3.1.2 Morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen

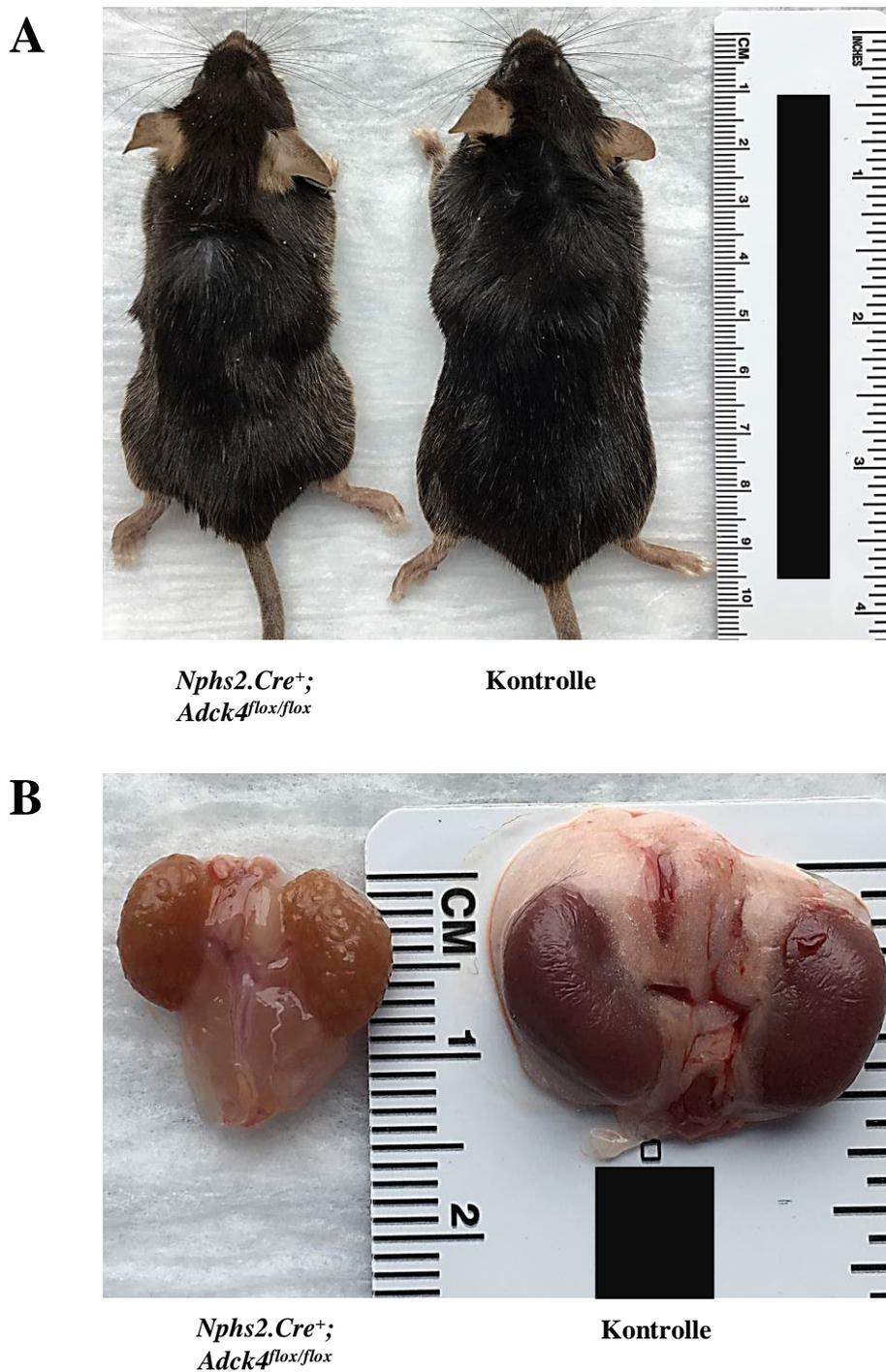


Abbildung 9: Mäuse mit Adck4 Mangel zeigten eine erhöhte Morbidität und morphologische Veränderungen der Nieren.

(A) Fotografie der Mäuse mit beschriebenem Genotyp im Alter von zehn Monaten. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren die *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{flox/flox}* Mäuse in schlechterer körperlicher Verfassung.

(B) Fotografie der Nieren der Mäuse mit beschriebenem Genotyp im Alter von zehn Monaten. Morphologische Veränderungen der Nieren der *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{flox/flox}* Mäuse im Vergleich zu den Nieren der Wildtypiere waren sichtbar.

In den ersten Monaten ihres Lebens zeigten die *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flx/flx}* Mäuse keine Auffälligkeiten in Größe, Gedeihen oder Verhalten. Mit zunehmendem Alter insbesondere jenseits der fünf Monate entwickelten die Tiere körperliche Auffälligkeiten, sie wurden weniger aktiv, verloren zunehmend an Fell und wiesen eine gekrümmte Körperhaltung auf (**Abb. 9A**). Bei der Obduktion der *Adck4^{APodocyte}* Mäuse im Alter von zehn Monaten fielen verkleinerte und blasse Nieren mit einer unregelmäßigen Oberfläche im Vergleich zu ihren gesunden Wurfgeschwistern auf (**Abb. 9B**). Dieser Fund deutet darauf hin, dass der Mangel von Adck4 in Mäusen zu einer strukturellen und funktionellen Störung der Nieren führt.

3.1.3 Gewichtsverlaufsanalyse

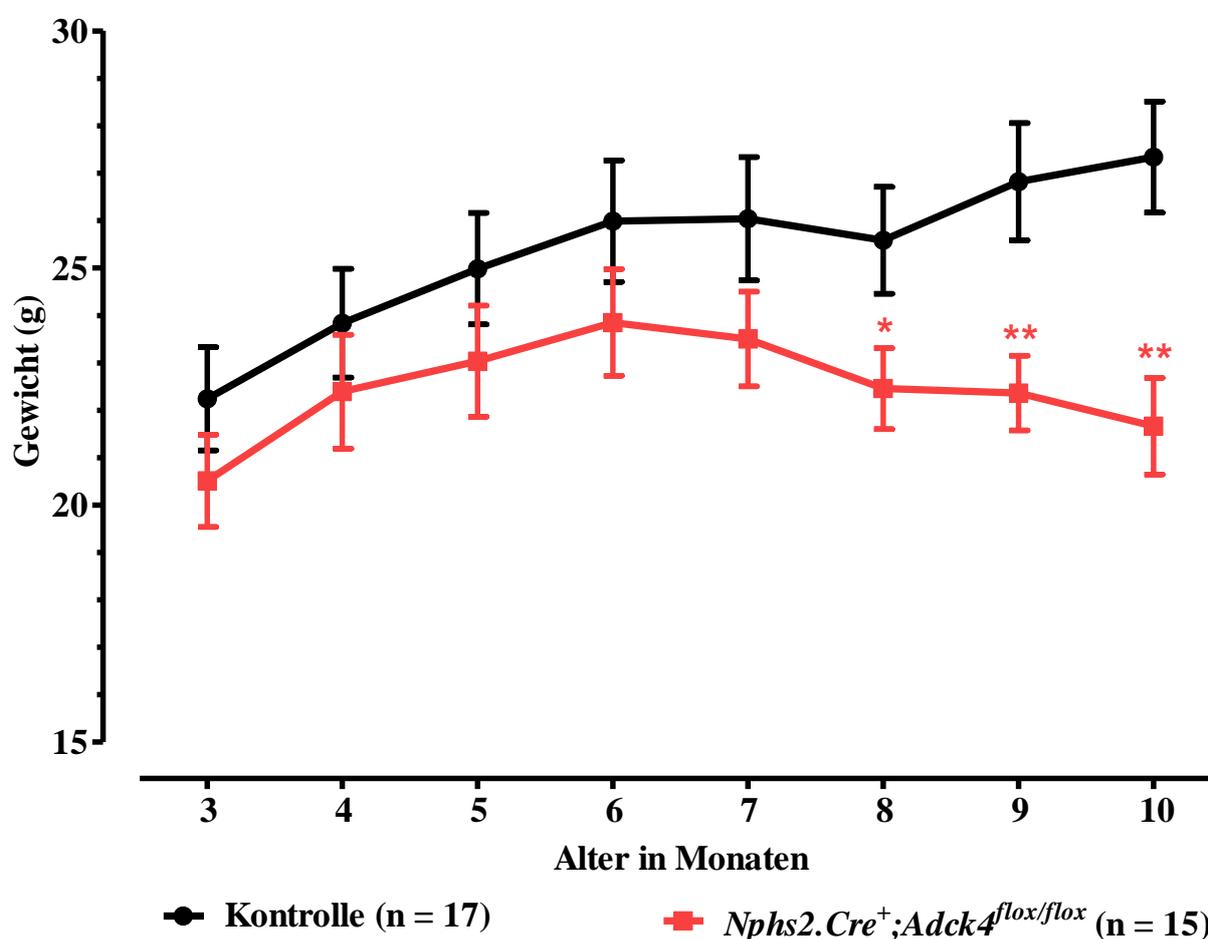


Abbildung 10: Analyse des Gewichtsverlaufs. Der Vergleich des Gewichtsverlaufs von *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flx/flx}* Mäusen mit ihren gesunden Wurfgeschwistern zeigte eine signifikante Reduzierung des Körpergewichts der Tiere mit Adck4 Mangel. Das Gewicht wurde monatlich im Alter von drei bis zehn Monaten gemessen. (n= 15-17 Tiere in jeder Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Fehlerbalken entsprechen SEM, Statistik wurde mittels zweiseitigen t-Test berechnet).

Ein weiterer Parameter, der analysiert wurde, ist das Gewicht. Im Alter von drei bis sechs Monaten zeigten sowohl *Adck4* ^{Δ Podozyt} Mäuse und Kontrolltiere eine Gewichtszunahme (Abb. 10). Ab einem Alter von acht Monaten verloren die *Adck4* ^{Δ Podozyt} Mäuse signifikant an Gewicht, während die gesunden Kontrolltiere im gleichen Alter weiter an Gewicht zunahmen (Abb. 10).

3.1.4 Verlaufsanalyse des Überlebens

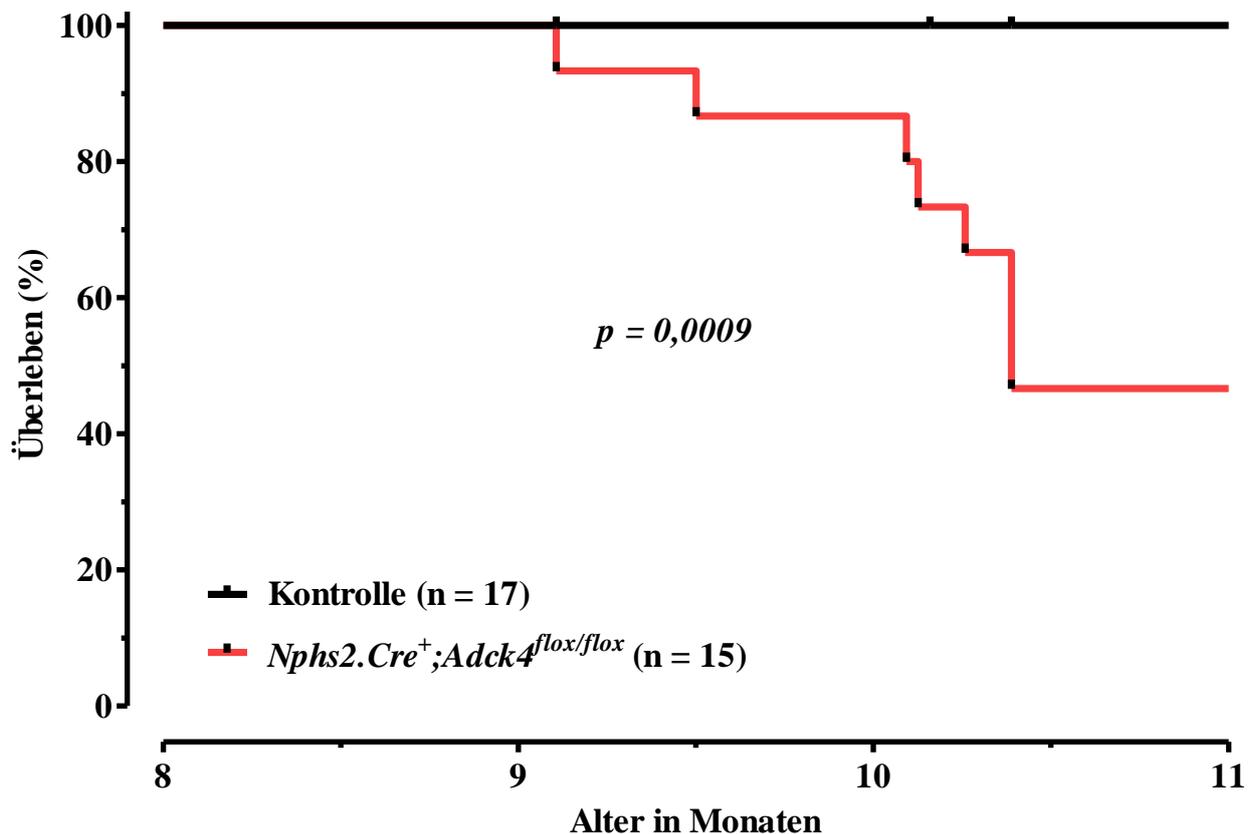


Abbildung 11: Verlaufsanalyse des Überlebens. Der Knockout von *Adck4* führte zu einer signifikant verringerten Lebensspanne der Mäuse mit einem medianen Überleben von 10,4 Monaten im Vergleich zur Kontrollkohorte. (n=15-17 in jeder Gruppe. Log-rank [Mantel-Cox] test, $p = 0,0009$; Hazard Ratio [logrank] beträgt 11,13).

Die Analyse der Lebenserwartung der *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{lox/lox} Mäuse im Vergleich mit ihren Wurfgeschwistern zeigte eine signifikante Verringerung der Lebensspanne ($p = 0,0009$) (Abb. 11). Die Ereignispunkte der Überlebenskurve der Kontrollkohorte repräsentieren zensierte Datenpunkte, welche als histologische und ultrastrukturelle Kontrollen dienen. Das mediane Überleben der *Adck4* ^{Δ Podozyt} Tiere betrug 10,4 Monate. Die statistische Auswertung des medianen Überlebens generierte ein Hazard Ratio von 11,13. Die Überwachung der Mäuse erfolgte bis zu einem Alter von 18 Monaten, diese Arbeit präsentiert die Ergebnisse der Mäusestudie bis zum elften Lebensmonat. Die Beendigung des Experiments im Alter von 18 Monaten wurde gewählt,

da die Tiere dadurch bis zu einem fortgeschrittenen Alter überwacht wurden und die Folgen der Adck4 Mangel Erkrankung ausreichend eruiert werden konnten.

3.1.5 Analyse des Albumin/Kreatinin- Quotienten im Urin

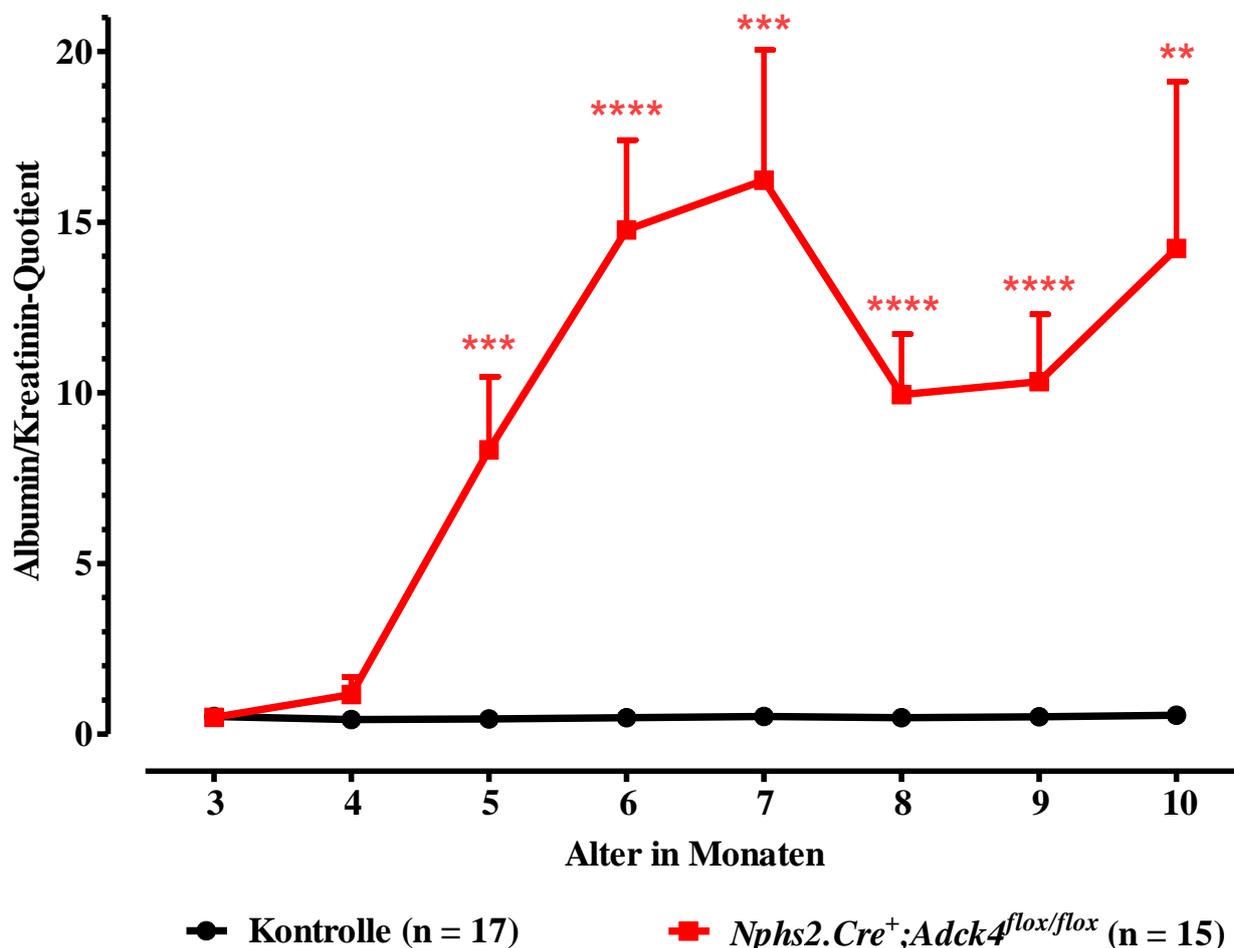
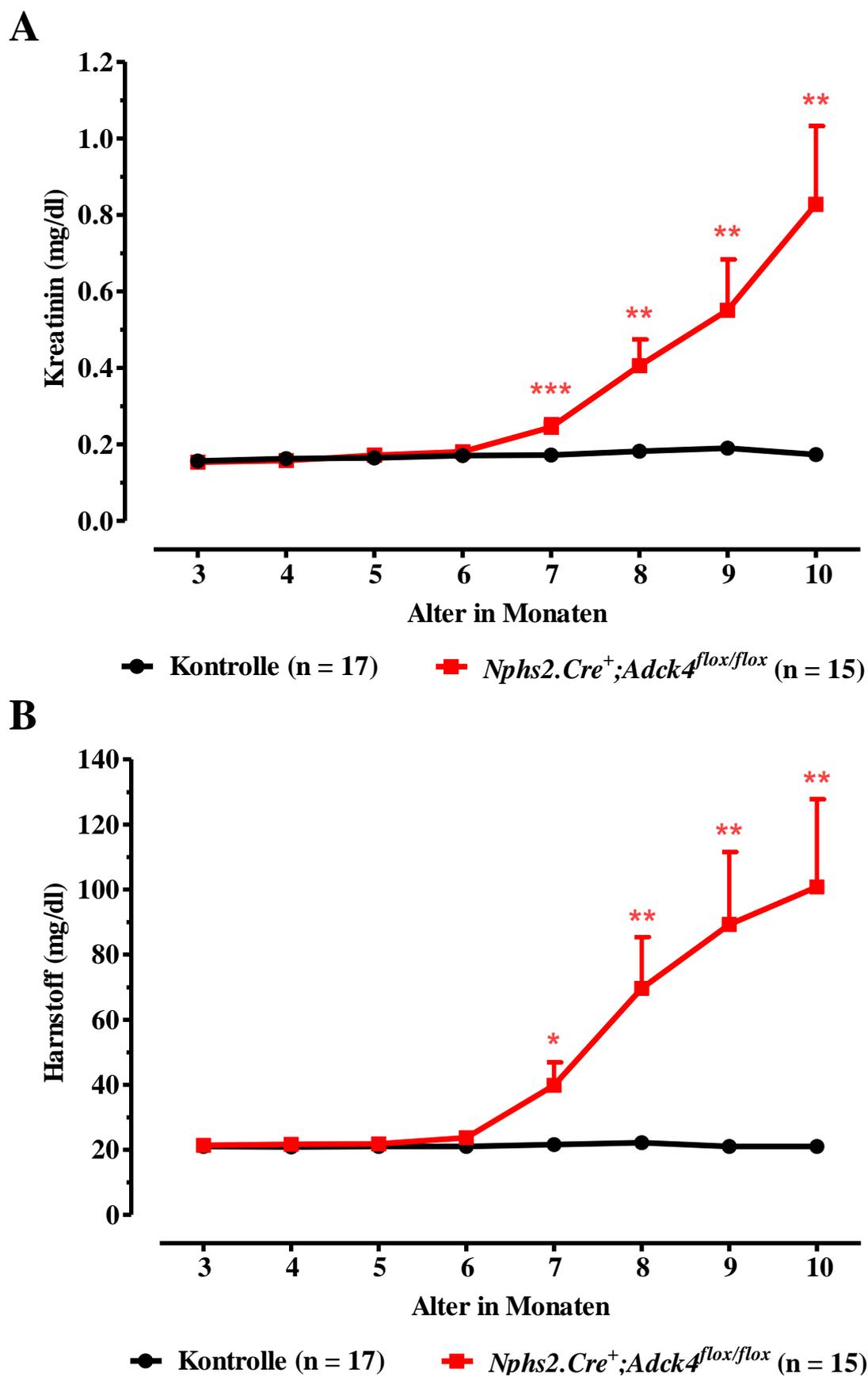


Abbildung 12: Verlaufsanalyse des Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin. *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/lox}* Mäuse entwickelten eine Proteinurie verglichen mit den Wurfgeschwistern. Die Urinkollektion erfolgte monatlich im Alter von drei bis zehn Monaten. (n= 15-17 Tiere in jeder Gruppe, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Fehlerbalken zeigen SEM, Statistik wurde mittels zweiseitigen t-Test berechnet).

Die *Adck4^{APodozyt}* Mäuse entwickelten ab einem Alter von vier Monaten eine progrediente schwerwiegende Proteinurie, welche bis zu einem Alter von sieben Monaten anstieg (**Abb. 12**). In den nachfolgenden Monaten sank der Wert des Albumin/Kreatinin-Quotienten ab, was sich einerseits durch die abnehmende Nierenfunktion und eingeschränkte Urinproduktion und andererseits durch einen Bias im Rahmen eines „survival of the fittest“ Effektes erklären lässt. Im Gegensatz hierzu betrug die mittlere Proteinurie der gesunden Wurfgeschwister maximal 0,55 mg/mg Krea.

3.1.6 Analyse von Kreatinin, Harnstoff, Albumin und Phosphat im Serum



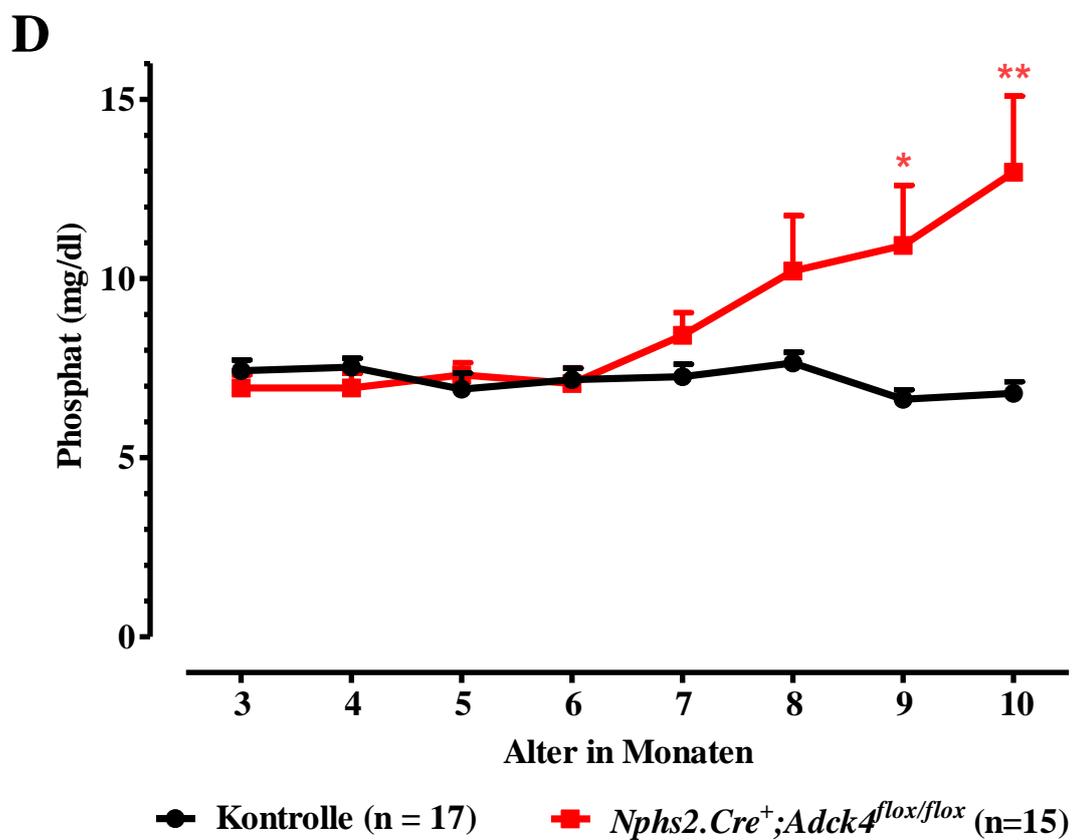
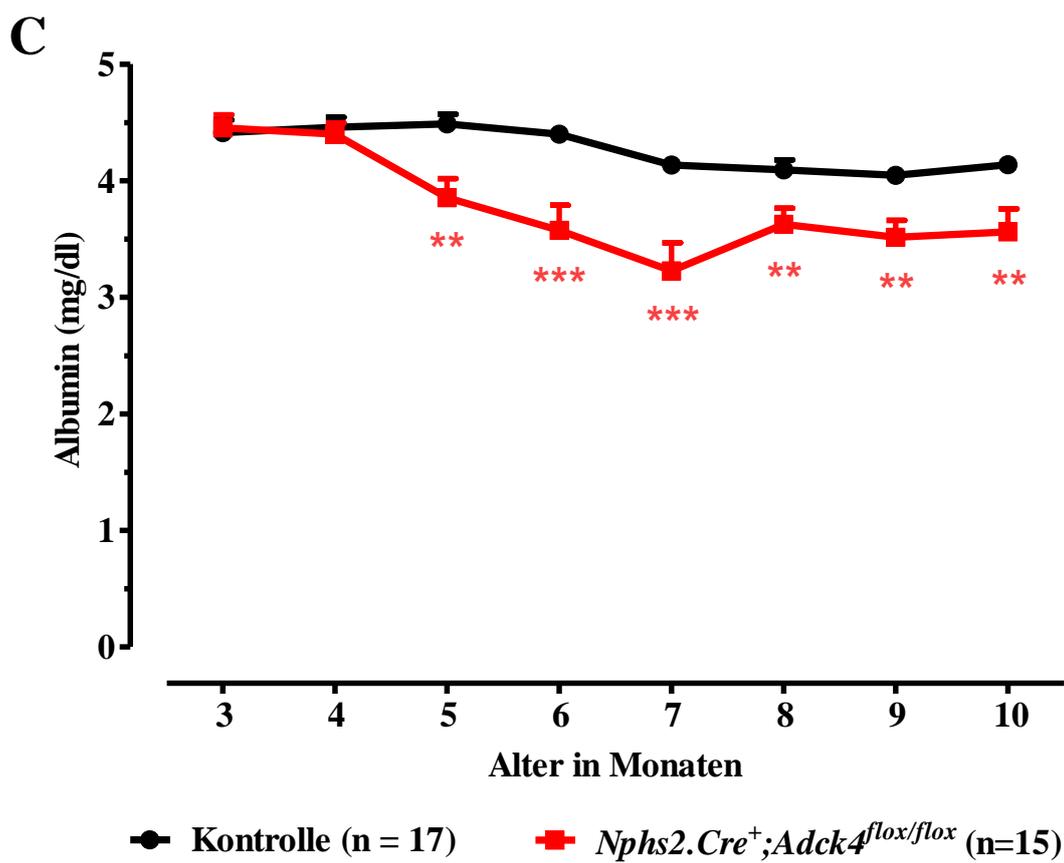


Abbildung 13: Analyse von Kreatinin, Harnstoff, Albumin und Phosphat im Serum.

Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox} Mäuse zeigten im Verlauf einen Anstieg der Nierenretentionswerte (**A** und **B**), eine Hypoalbuminämie (**C**) und eine Hyperphosphatämie (**D**) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Messwerte wurden monatlich im Alter von drei bis zehn Monaten erhoben. (n= 15-17 Tiere in jeder Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Fehlerbalken zeigen SEM, Statistik wurde mittels zweiseitigen t-Test berechnet).

Die Analyse von Kreatinin und Harnstoff im Serum der *Adck4* defizienten Mäuse zeigte ab dem Alter von sieben Monaten einen signifikanten Anstieg der Werte (**Abb. 13A, 13B**). Zusätzlich wurde eine signifikante Verringerung von Albumin ab dem fünften Lebensmonat der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt (**Abb. 13C**). Als ein weiterer funktioneller Parameter wurde Phosphat im Serum analysiert. Die *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse entwickelten im Alter von neun Monaten eine signifikante Hyperphosphatämie im Vergleich zu den Kontrolltieren (**Abb. 13D**).

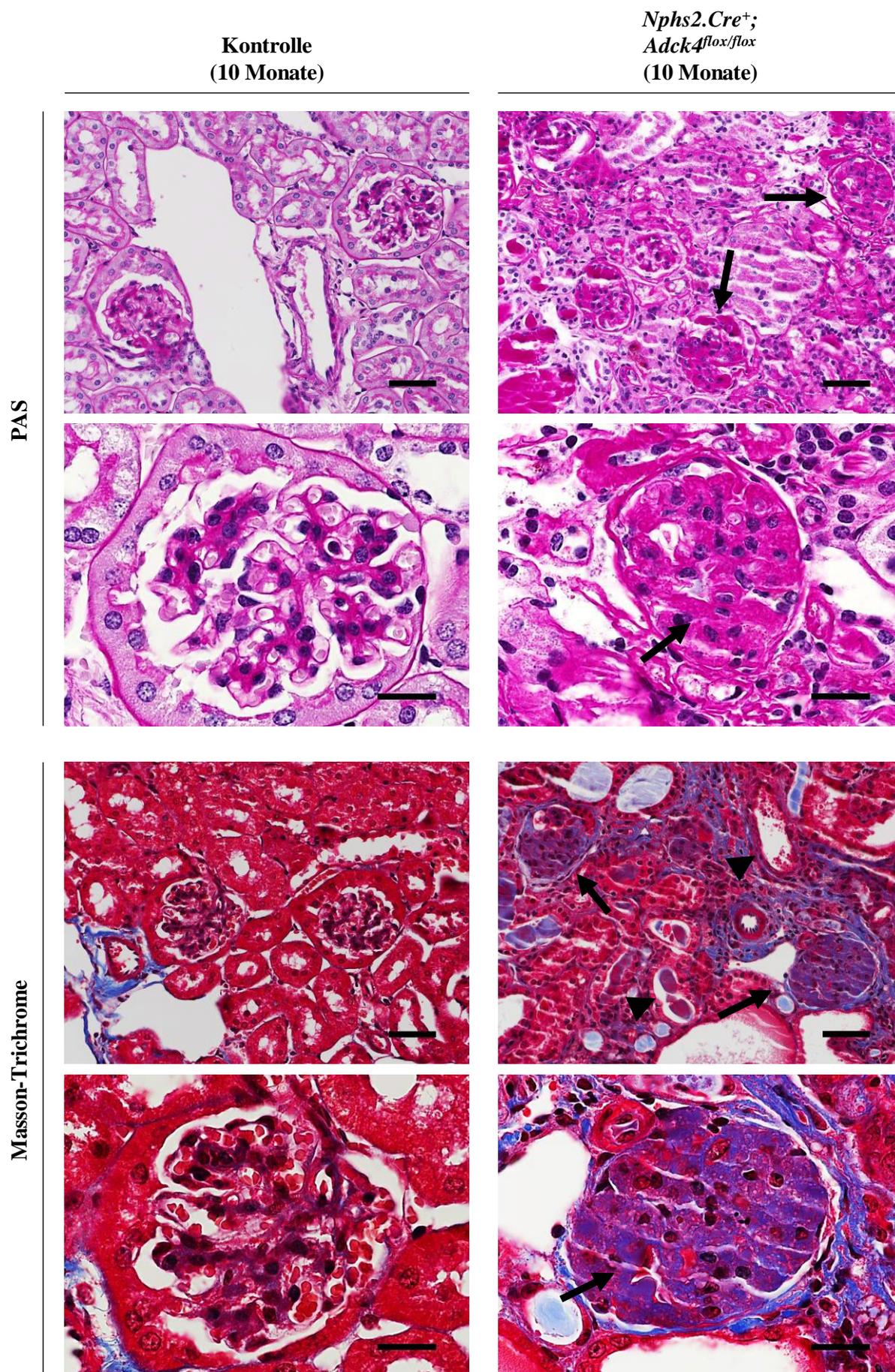
3.1.7 Zusammenfassung der quantitativen Assays

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der quantitativen, funktionellen Assays das Bild eines chronischen Nierenversagens mit einer früh beginnenden glomerulären Proteinurie und Albuminurie ab vier Monaten und einer später einsetzenden Erhöhung der Nierenretentionswerte der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse. Die fortschreitende Beeinträchtigung der Nierenfunktion hat letztlich eine erhöhte Morbidität und Mortalität der *Adck4* defizienten Mäuse zur Folge.

3.2 *Adck4* defiziente Mäuse entwickeln eine fokal segmentale Glomerulosklerose.

3.2.1 Histologische Analyse des Nierengewebes

Im Alter von zehn Monaten wurde den *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäusen und den Kontrolltieren Nierengewebe entnommen und fixiert. Die anschließende histologische Untersuchung des Gewebes erfolgte mittels H&E, PAS, Masson-Trichrome und Silberfärbung nach Jones unter Verwendung von Lichtmikroskopie (**Abb. 14**).



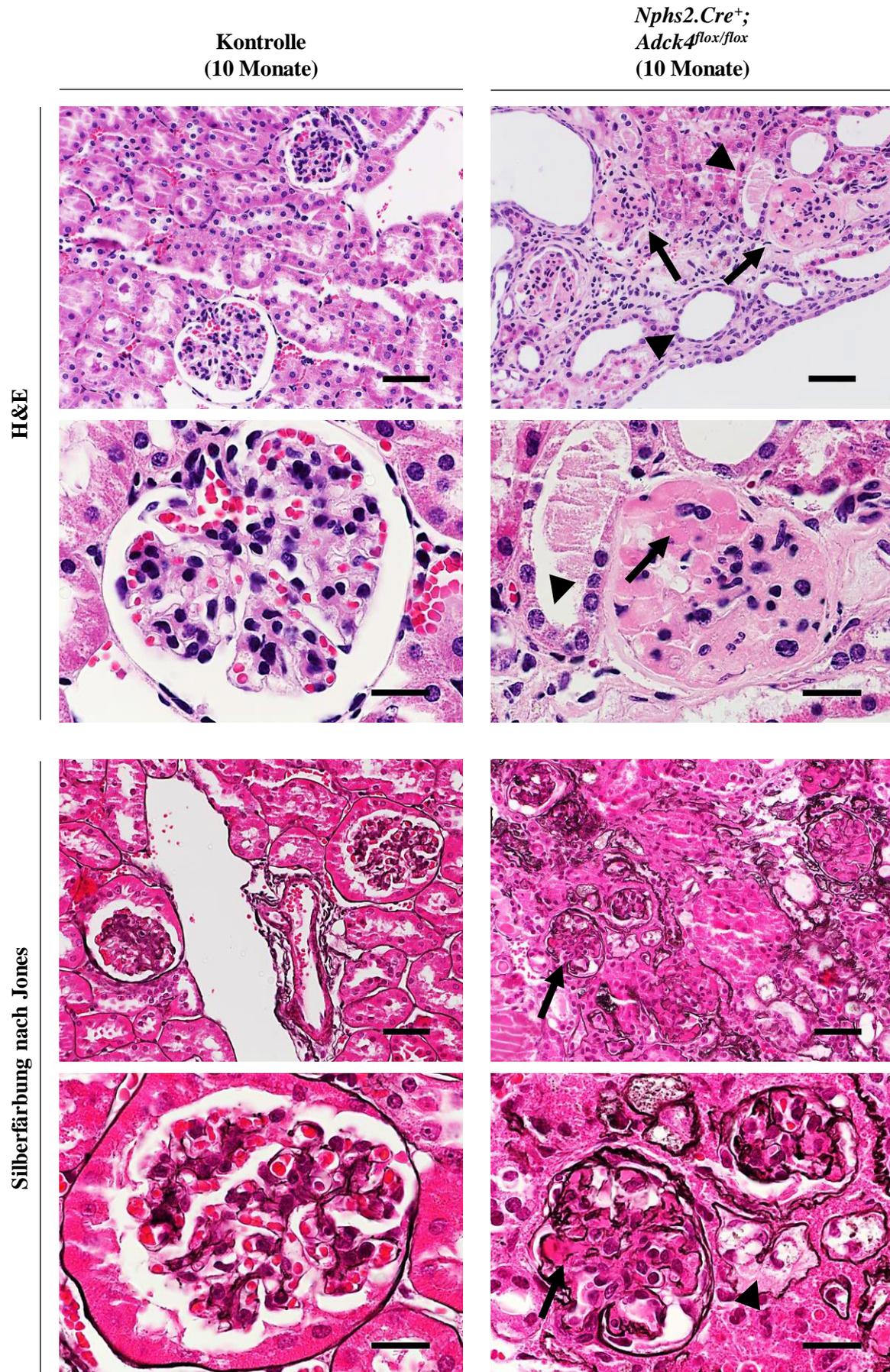


Abbildung 14: Histologische Analyse des Nierengewebes.

PAS, Masson-Trichrome, H&E und Silberfärbung nach Jones der zehn Monate alten *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/lox}* und Wildtyp Mäusen. Pfeile markieren die interstitielle Fibrose der Glomeruli, Pfeilspitzen markieren die tubuläre Atrophie der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/lox}* Mäuse. Maßstabsbalken entsprechen 50 µm in den jeweils oberen Reihen und 20 µm in den jeweils unteren Reihen.

Die Auswertung ergab eine beinahe vollständige globale und fokal segmentale glomeruläre Sklerosierung (FSGS) der *Adck4* defizienten Mäuse im Vergleich zur Kontrollkohorte, die ein normales Nierengewebe mit keinerlei FSGS-Läsionen aufwies (Abb. 14). Die feingeweblichen Auffälligkeiten gingen mit einer ausgeprägten interstitiellen Fibrosierung und tubulären Atrophie einher.

3.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Nierengewebes

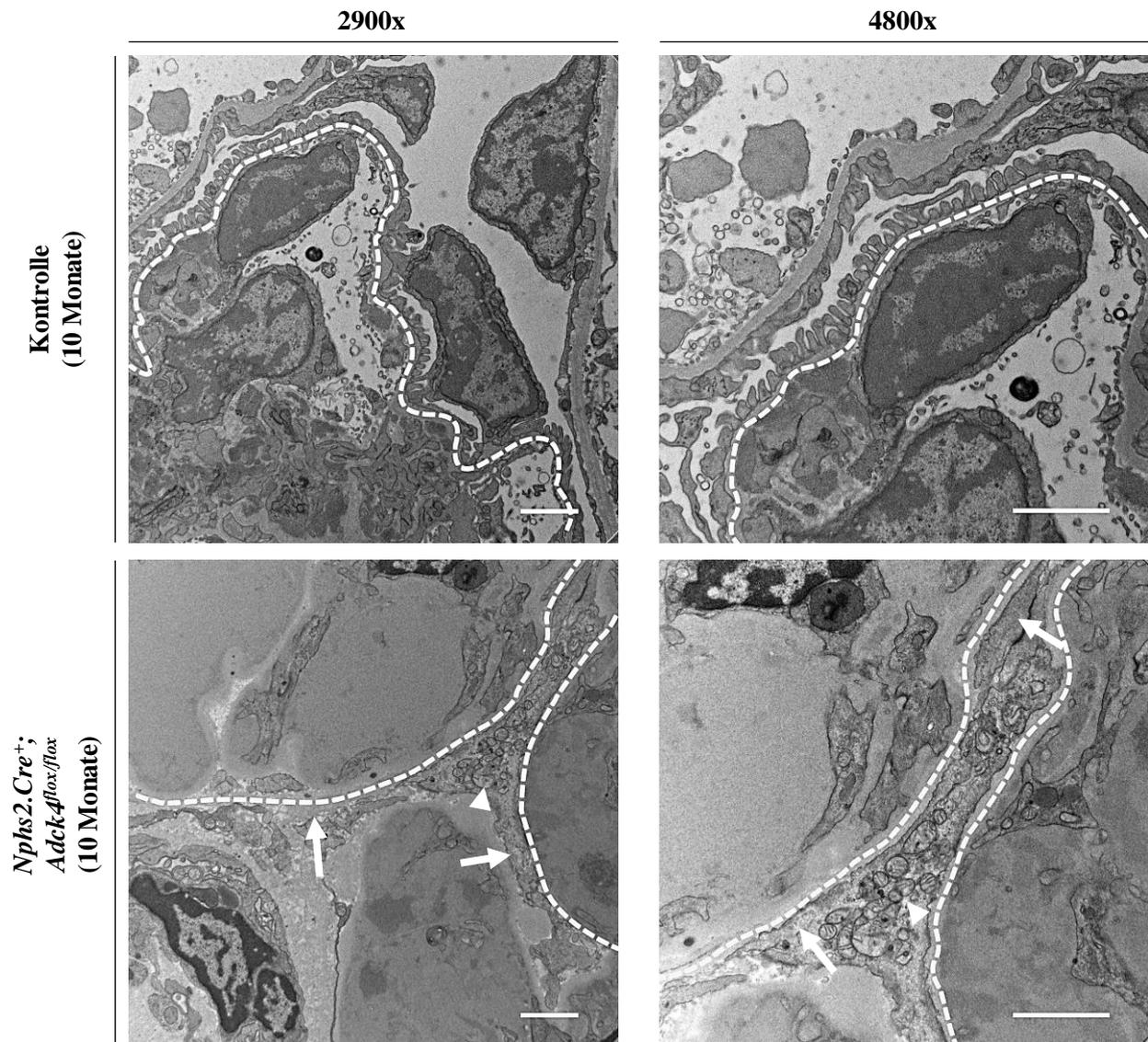


Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse des Nierengewebes.

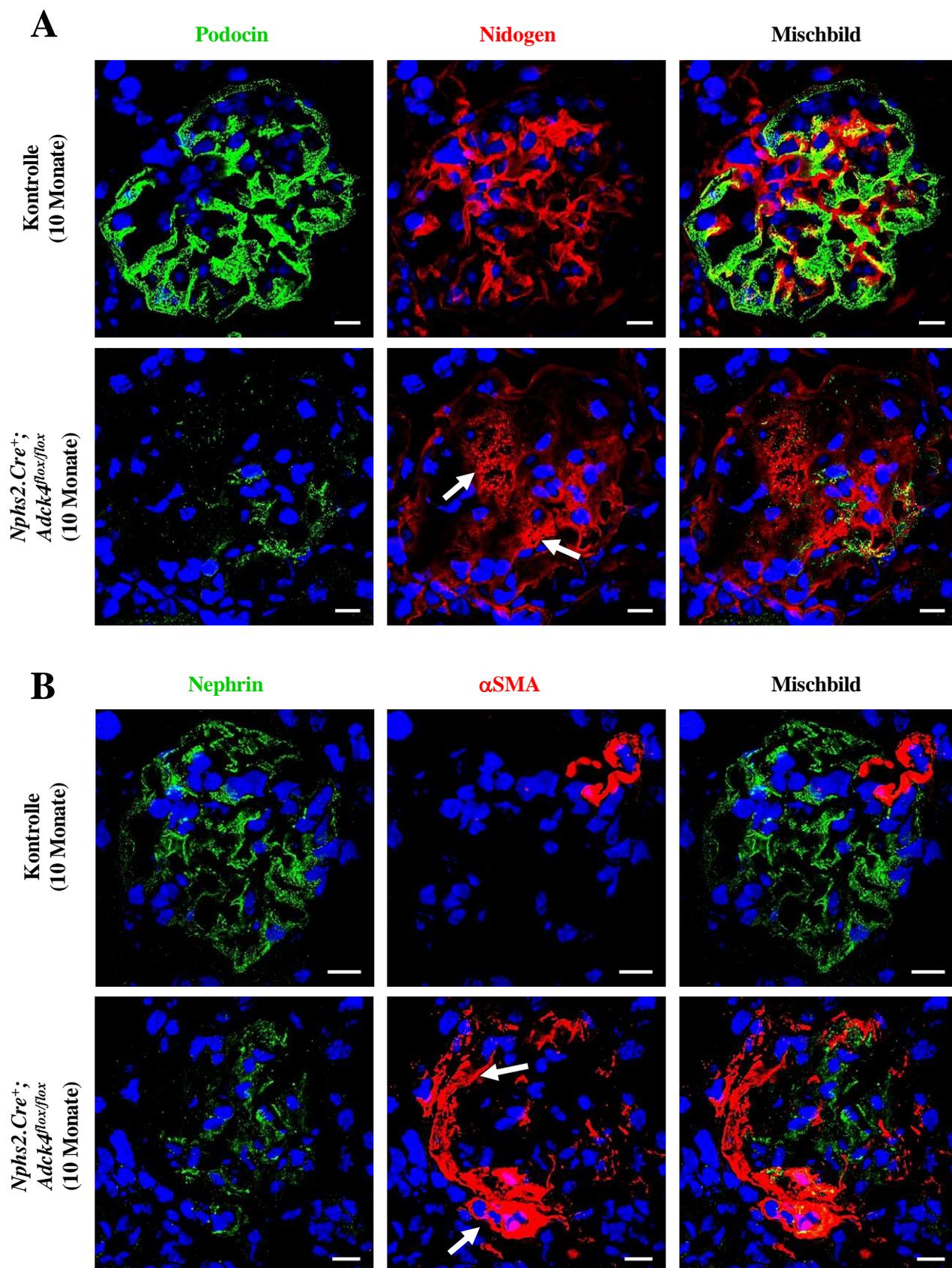
Zweidimensionale transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Nierengewebes der zehn Monate alten Kontrollen und *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Tiere. Die *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäuse zeigten eine Verschmelzung der podozytären Fußfortsätze, dagegen waren die Fußfortsätze der Kontrolltiere regelrecht entwickelt. Die glomeruläre Basalmembran ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. Pfeile markieren das irreguläre Zellfortsatznetzwerk der Podozyten. Außerdem wurde eine erhöhte Anzahl morphologisch auffälliger Mitochondrien in den Podozyten der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäuse sichtbar (Pfeilspitzen). Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μm .

Im Alter von zehn Monaten wurden den *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäusen und Kontrolltieren Nierengewebe entnommen und mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Die Auswertung der zweidimensionalen Ultrastrukturaufnahmen der Podozyten zeigte, dass die podozytäre Fußfortsätze der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäuse schwerwiegende morphologische

Veränderungen aufwies, während sich das Zellfortsatznetzwerk der Kontrolltiere als normal entwickelt darstellte (**Abb. 15**). Außerdem wirkten die Mitochondrien der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse irregulär und strukturell auffällig. Diese Beobachtungen passen sehr gut zu der Lokalisation und vermuteten Funktion von Adck4.

3.2.3 Immunfluoreszenzanalyse des Nierengewebes

Immunfluoreszenzaufnahmen des Nierengewebes wurden analysiert, um einen Einblick in die molekularen Auffälligkeiten der Podozyten der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse zu bekommen. Dafür wurden Marker für die Schlitzmembranproteine Podocin und Nephrin, sowie für das Basalmembranprotein Nidogen und für die Myelofibroblastenaktivierung α SMA verwendet.



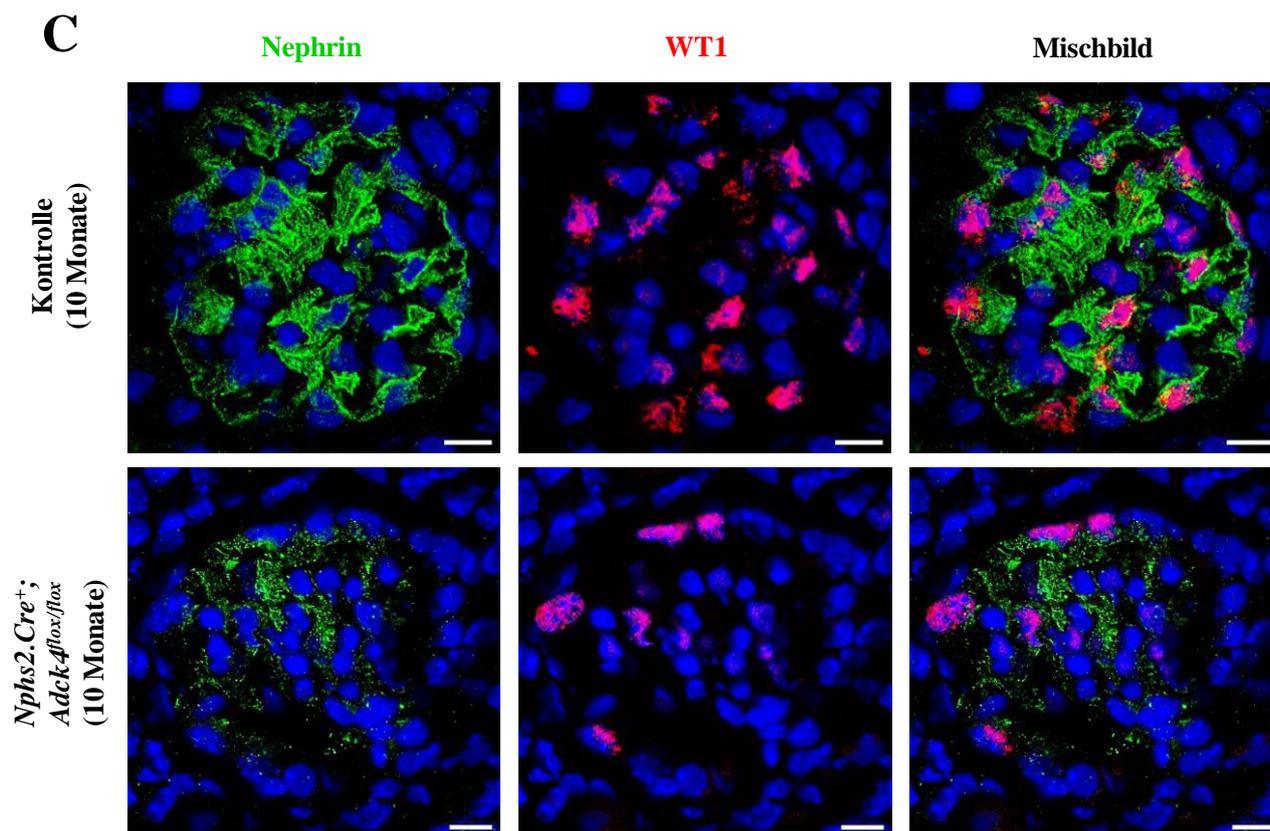


Abbildung 16: Die Immunfluoreszenz Analyse des Nierengewebes der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{lox/flox}* Mäuse zeigte glomeruläre Fibrose.** Immunfluoreszenzfärbung der schockgefrorenen Schnitte des Nierengewebes der zehn Monate alten Tiere mit aufgeführten Genotypen.

(A) Es wurden Antikörper gegen das Schlitzmembranprotein Podocin und das Basalmembranprotein Nidogen verwendet. Die *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäuse zeigten eine verringerte Expression des podozytären Markers Podocin im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dagegen war die Expression von Nidogen in *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäusen lokal erhöht (Pfeile).

(B) Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen das Schlitzmembranprotein Nephrin und den Myelofibroblastenmarker α SMA markiert. Der podozytäre Marker Nephrin war in den *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäusen verglichen mit den Wildtypen verringert. Eine glomerulär-fokale Erhöhung des Myelofibroblastenmarkers (Pfeile) ließ sich bei *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäusen im Vergleich zu den Wurfgeschwistern nachweisen.

(C) Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen das podozytenspezifische Kernprotein WT1 und den podozytären Marker Nephrin eingefärbt. In dieser Doppelfärbung war die verringerte Anzahl von Podozyten in den Glomeruli der *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäuse im Vergleich zu den Wurfgeschwistern erkennbar. Die Maßstabsbalken aller Abbildungen entsprechen 10 μ m.

Im Vergleich mit den Kontrolltieren zeigte sich, dass die podozytären Marker Podocin und Nephrin der *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* im Vergleich zu den Wurfgeschwistern reduziert waren (**Abb. 16A und 16B**). Dagegen wies Nidogen stellenweise eine erhöhte Expression gegenüber den Kontrolltieren auf (**Abb. 16A**). Außerdem ließ sich eine Veränderung des Färbemusters von Nidogen in den *Nphs2.Cre⁺;**Adck4^{lox/flox}* Mäusen beobachten, das Basalmembranprotein wirkte

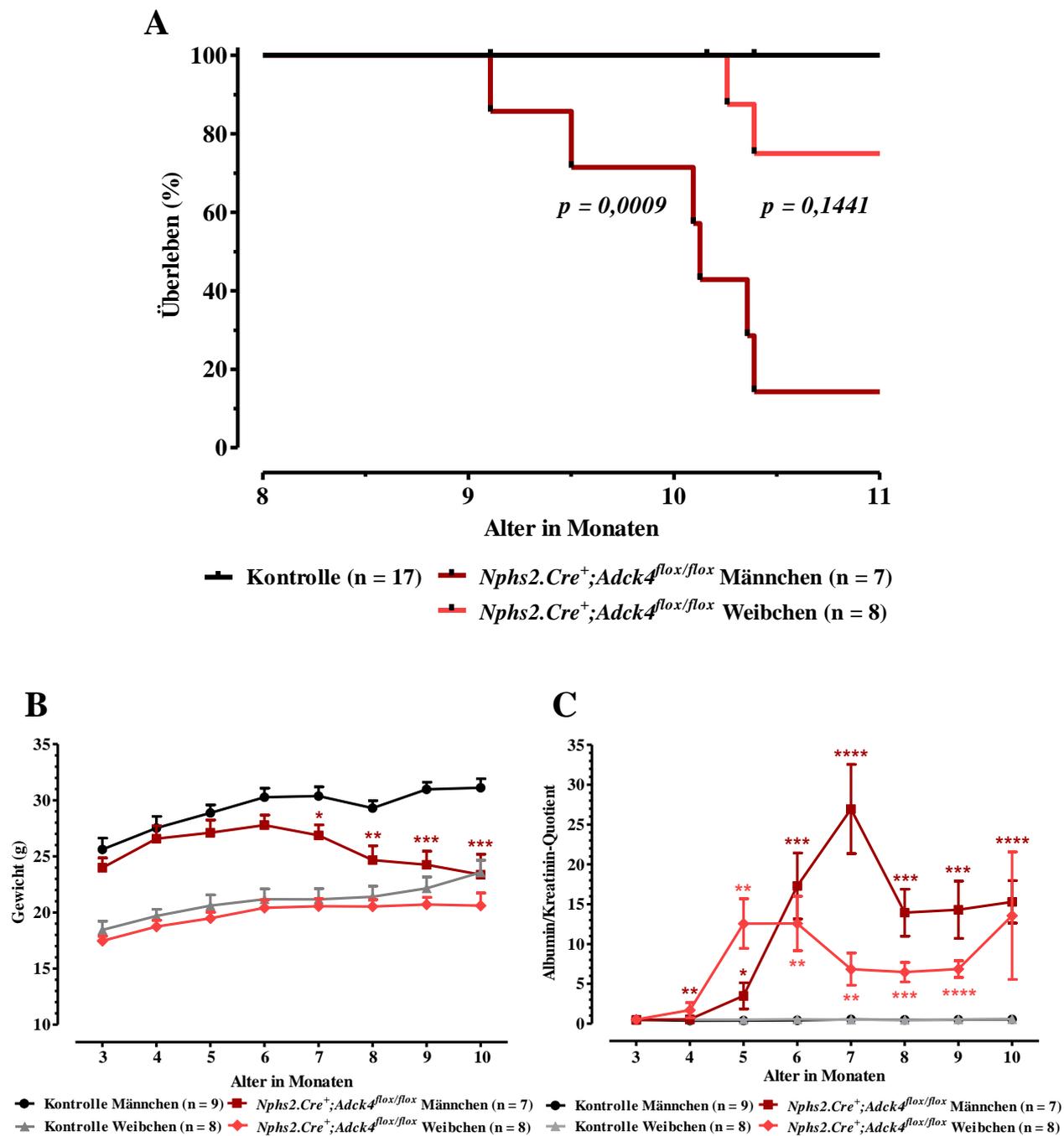
stellenweise verbreitert exprimiert und die wabenförmige Anfärbung der Basalmembran der Kontrolltiere schien aufgehoben zu sein (**Abb. 16A**). Zusammen mit der Erhöhung des Myelofibroblastenmarkers α SMA in den glomerulären Strukturen (**Abb. 16B**) bestätigen diese Funde die fortschreitende Sklerosierung der Glomeruli bei *Adck4* Mangel. Zusätzlich zeigte die WT1- und Nephtrin-Doppelfärbung (**Abb. 16C**) lokal eine verminderte Expression beider Marker in den Glomeruli der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies spricht insgesamt für einen realen Verlust der Podozyten und nicht nur der podozytären Expression.

3.2.4 Zusammenfassung der histologischen und ultrastrukturellen Analysen

Zusammengefasst entsprechen die histologischen und ultrastrukturellen Analysen der zehn Monate alten *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäuse dem pathologischen Bild einer weit fortgeschrittenen fokal segmentalen Glomerulosklerose. Es wurden histologische Veränderungen der Glomeruli und der Verlust des komplexen Fußfortsatznetzwerkes sichtbar gemacht. Ebenfalls konnte eine veränderte Proteinexpression der Zellen des Glomerulus mit deutlich verringerter Expression von drei unabhängigen podozytentypischen Markern (Nephtrin, Podocin, WT1) sowie konsekutiv dem Schlitzmembranprotein Nephtrin in benachbarter Position nachgewiesen werden. Eine indirekte Einflussnahme dieser Podozytenveränderungen auf andere Zellen des Glomerulus zeigt sich in der „de novo“ Aktivierung von Mesangiumzellen zu typischen Myelofibroblasten charakterisiert durch signifikant vermehrte α SMA Expression.

3.3 Unterschiede im Krankheitsverlauf des chronischen Nierenversagens von weiblichen und männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäusen

Nachdem klinische Unterschiede in der Entwicklung der Nierenerkrankung zwischen weiblichen und männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäusen auffielen, wurden die gesammelten Daten nach Geschlecht der Tiere aufgetrennt ausgewertet.



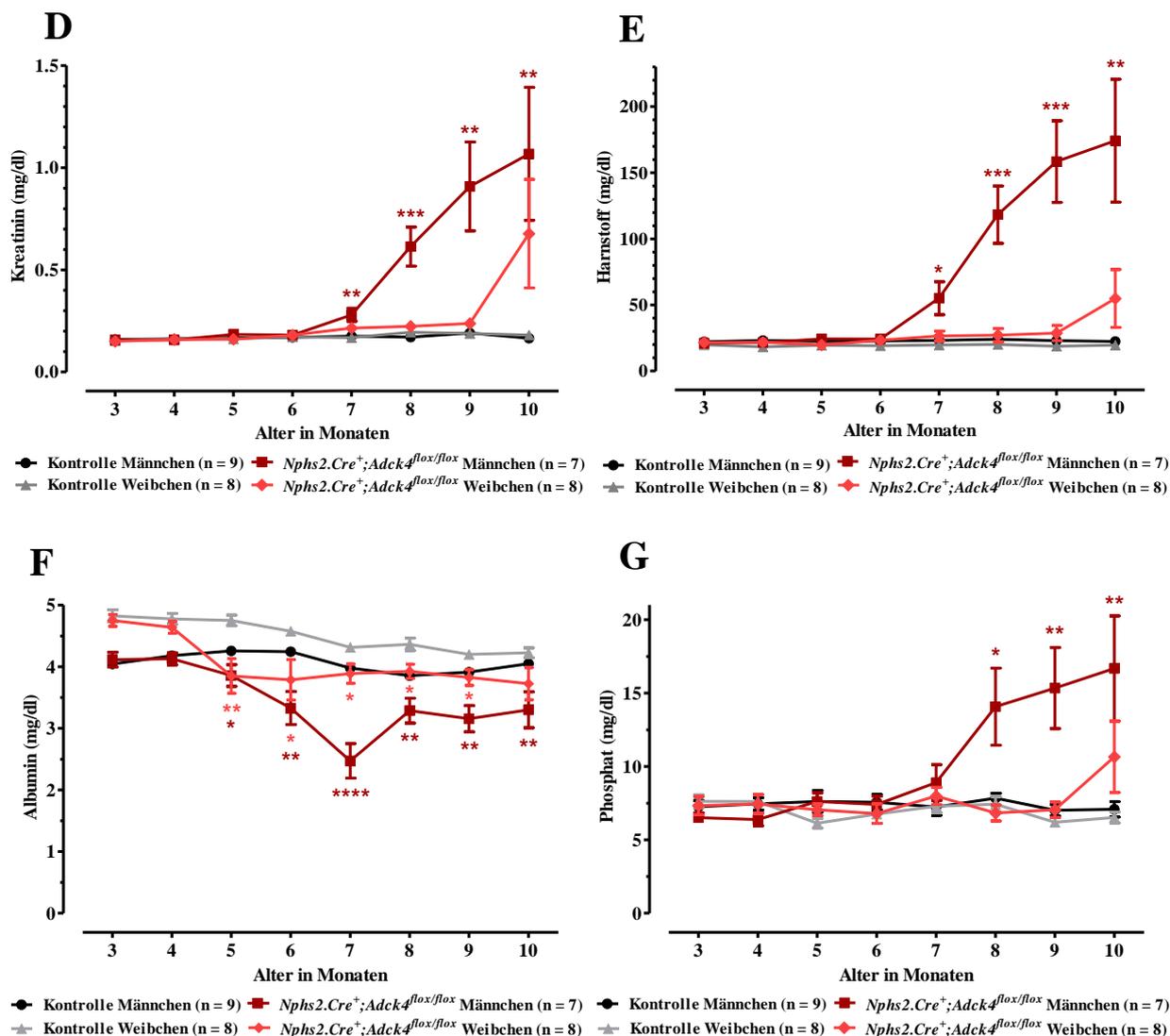


Abbildung 17: Vergleich des Verlaufs der Nierenerkrankung von weiblichen und männlichen Tieren mit Adck4 Mangel.

(A) Verlaufsanalyse des Überlebens der weiblichen und männlichen *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Mäuse verglichen mit der Kontrollkohorte. (Weibliche *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Tiere: Log-rank [Mantel-Cox] test, $p = 0,1441$; Hazard Ratio [logrank] 7,935; männliche *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Tiere: Log-rank [Mantel-Cox] test, $p < 0,0009$; Hazard Ratio [logrank] 17,88).

(B) Vergleich des Gewichtsverlaufs von männlichen und weiblichen *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Mäusen mit Kontrolltieren.

(C) Vergleich des Verlaufs des Albumin-Kreatinin-Quotienten von männlichen und weiblichen *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Tieren mit den Kontrolltieren.

(D) Vergleich des Verlaufs von Kreatinin, (E) Harnstoff, (F) Albumin und (G) Phosphat im Serum von weiblichen und männlichen *Nphs2.Cre+;Adck4flox/flox* Mäusen mit den Wurfgeschwistern. (n= 7-9 Tiere in jeder Gruppe, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, Fehlerbalken zeigen SEM, Statistik wurde mittels zweiseitigen Student's t-Test berechnet, Messwerte wurden monatlich erhoben im Alter von drei bis zehn Monaten)

Die Analyse des Überlebens der männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Tiere im Vergleich zu den weiblichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Tieren im Alter von drei bis zehn Monaten zeigte ein früher einsetzendes Sterben der männlichen Tiere (**Abb. 17A**) mit einem medianen Überleben von 10,1 Monaten. Zwischen dem zehnten und den elften Lebensmonat starben zwei der weiblichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse, wengleich bis zu diesem Zeitpunkt bereits sechs männliche *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse verstorben waren.

Die Analyse des Gewichtsverlaufs der Tiere ist ein weiterer Parameter zur Beurteilung der körperlichen Verfassung der Mäuse. Dabei zeigten die männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse ab dem siebten Lebensmonat einen signifikanten Gewichtsverlust im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern (**Abb. 17B**). Dagegen blieb das Gewicht der weiblichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse verglichen mit den weiblichen Kontrolltieren stabil (**Abb. 17B**).

Die männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäuse entwickelten ab einem Alter von fünf Monaten eine Proteinurie, die bis zum siebten Lebensmonat stark zunahm und danach etwas abfiel (**Abb. 17C**). Die weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäuse zeigten ab dem vierten bis fünften Lebensmonat eine deutliche Proteinurie, die ab dem sechsten Lebensmonat etwas abfiel und zum zehnten Lebensmonat wieder stark anstieg (**Abb. 17C**). Insgesamt begann die Proteinurie der weiblichen und männlichen *Adck4* defizienten Tiere zu einem ähnlich frühen Zeitpunkt, dabei stieg der Albumin/Kreatinin-Quotient der weiblichen Mäuse etwas früher, jedoch weniger stark an. Sowohl weibliche als auch männliche *Adck4* defiziente Mäuse zeigten im Alter von sechs bzw. sieben Monaten ein Rückgang der Proteinurie, um dann in zehnten Lebensmonat ein ähnliches Niveau zu erreichen.

Die Analyse der Nierenretentionswerte erbrachte einen deutlichen signifikanten Anstieg von Serum-Kreatinin (**Abb. 17D**) und -Harnstoff (**Abb. 17E**) der männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse ab dem siebten Lebensmonat. Dagegen war nur eine geringere, nicht signifikante Steigerung von Serum-Kreatinin (**Abb. 17D**) und -Harnstoff (**Abb. 17E**) der weiblichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse im zehnten Lebensmonat feststellbar.

Sowohl weibliche als auch männliche *Adck4* defiziente Mäuse zeigten ab einem Alter von fünf Monaten eine signifikante Hypoalbuminurie (**Abb. 17F**), wobei der Verlust von Albumin im Serum bei den männlichen Tieren stärker ausfiel. Männliche *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Tiere entwickelten ab dem achten Lebensmonat eine signifikante Hyperphosphatämie (**Abb. 17G**). In weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Tieren konnte ein Anstieg des Phosphats im Serum im zehnten Lebensmonat beobachtet werden, dieser war jedoch schwächer und nicht signifikant (**Abb. 17G**).

4. Methodenkritik

Die Nachahmung und Untersuchung von menschlichen Krankheiten im Mausmodell ist ein beliebtes Werkzeug der Wissenschaft. Die Hauptprobleme in der Beurteilung von menschlichen Nierenerkrankungen bestehen vor allem im unklaren Beginn der Erkrankung, der verzögerten Detektion und dem generellen Fehlen von repetitiven, histopathologischen Evaluationen im weiteren Verlauf aufgrund der Invasivität der Nierenbiopsien. Aber wie bei jedem Modell stellt sich die Frage, wie gut die gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Die Vorteile von Mäusestudien sind geringe Kosten, eine kurze Gestationszeit von ca. drei Wochen mit einer Wurfgröße von zwei bis zwölf Jungen und die Möglichkeit der genetischen Manipulation (Azushima et al., 2018).

Wie sehr ähneln sich Menschen- und Mäuseniere? Die menschliche Niere besitzt etwa 1.000.000.000 Nephrone, die Niere der Mäuse dagegen etwa 16.000 Nephrone (Lindström et al., 2018).

Die embryonale Entwicklung der Niere im Menschen dauert etwa 30-33 Gestationswochen. In der Maus verläuft dieser Prozess über 13-14 Tage (Lindström et al., 2018). Makroskopisch weisen Aufbau von Niere und Nierenkörperchen beider Spezies große Ähnlichkeiten auf, doch es wurden auch Unterschiede in Aufbau, Maßstab, Organisation und Genexpression von Zellstrukturen nachgewiesen (Lindström et al., 2018).

Ein weiterer Aspekt einer aussagekräftigen Studie ist die Reproduzierbarkeit der Versuche. Eine wichtige Variable sind die Umgebungsbedingungen, denen die Mäuse ausgesetzt sind (Justice and Dhillon, 2016), (Prendergast et al., 2014). Um einen möglichst pathogenfreien Lebensraum der Mäuse zu garantieren, wurden strenge Hygieneregeln beim Betreten der Mäuseräume eingehalten und der Zugang für Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen limitiert. Die Haltung der Tiere unterlag den Auflagen der Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals und ihre Gesundheit wurde täglich überprüft (siehe Kapitel 2.2.1). Dennoch ist die Umgebung der Mäuse nicht steril und kann die Gesundheit der Mäuse beeinflussen. In der Regel lebten die Mäuse in Gruppen von maximal fünf Tieren in einem Käfig, wenn möglich, wurden alle Tiere innerhalb eines Käfigs in die Studie eingeschlossen, da sie den gleichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt waren. In wenigen Fällen mussten männliche Mäuse nach aggressiven Kämpfen mit ihren Artgenossen vereinzelt untergebracht werden. Dieses solitäre Dasein kann Einfluss auf den Phänotyp der Tiere nehmen (Justice and Dhillon, 2016, Prendergast et al., 2014).

In dieser Studie wurde ein Cre-Rekombinase System verwendet, um einen spezifischen Knockout des *Adck4*- Gens in den Podozyten der Mäuse zu generieren (siehe Kapitel 2.2.1). Bei erfolgreicher

Verwendung des Systems wurden die Exons 5 und 6 aus dem Genom der Mauspodozyten entfernt und die Menge von *Adck4* in den Podozyten wurde deutlich bis vollständig dezimiert. Diese Genmanipulation führte immer zur großen Deletion von zwei Exons. Patienten und Patientinnen mit ADCK4 Mangel weisen dagegen ein breites Spektrum an verschiedenen Mutationsarten wie Punktmutationen, Insertionen und Deletionen auf (Ashraf et al., 2013, Atmaca et al., 2017, Korkmaz et al., 2016). Die Auswirkungen dieser unterschiedlichen spezifischen Mutationen auf den Phänotyp im Mausmodell konnte durch die Verwendung des Cre-Rekombinase Systems in diesem Mausmodell daher nicht untersucht werden.

Der Erfolg des podozytenspezifischen Knockouts von *Adck4* in den Mäusen wurde stichprobenartig überprüft. Dennoch könnte ein Misserfolg der genetischen Manipulation eine Erklärung dafür sein, dass einige wenige Tiere einen wesentlich geringer ausgeprägten bis unauffälligen Phänotyp entwickelten.

Die Verwendung von Cre-Rekombinase für die Generierung eines konditionellen Knockouts ist häufig. Allerdings kann die Cre-Rekombinase weitere unspezifische Effekte auf das Genom der Tiere haben (Lexow et al., 2013), daher wurden ebenfalls Wildtyp Tiere mit genomischer Cre-Rekombinase als Kontrollen verwendet.

Die hier dargestellten Arbeiten sind Teil einer Mäusestudie zur Behandlung von *Adck4* defizienten Mäusen mit 2,4-Dihydroxybenzoesäure (2,4-diHB). Die gesamte Studie beobachtete die Mäuse bis zu einem Alter von 18 Monaten. Daher erfolgte die quantitative Auswertung einiger Daten erst am Ende der Studie und konnte in dieser Arbeit nur aus der zugehörigen Publikation (Widmeier et al., 2020) zitiert werden. Die Fallzahlkalkulation dieser Mäusestudie zielte auf die therapeutische Intervention mit 2,4-diHB ab, es wurde festgelegt, 17 Tiere in der Kontrollgruppe und 15 Tiere in der Knockoutgruppe einzusetzen. Um die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zu beurteilen waren die Berechnungen nicht ausgelegt, daher sind die Fallzahlen mit sieben bis neun Tieren pro Gruppe zwar ausreichend, aber nicht erschöpflich.

Nach der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass zur longitudinalen Beobachtung der Mäuse Überlebensbiopsien einen weiteren wichtigen Informationszugewinn gebracht hätten. Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäusen würden histologische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten einen genaueren Einblick in Beginn und Verlauf der chronischen Nierenerkrankungen der Tiere bringen. Durch longitudinale histologische Untersuchungen der Mäusenieren könnte auch ein genauerer Ablauf der Aktivierung der Mesangiumzellen detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mausversuche ein gutes und reichlich erprobtes Modell zur Nachahmung von menschlichen Krankheiten bieten. Zur Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit waren das Mausmodell und der Aufbau des Versuches letztlich gut geeignet.

5. Diskussion

5.1 *Adck4*-Knockout Mäuse entwickelten ein chronisch progredientes Nierenversagen mit globaler Glomerulosklerose

Über einen Beobachtungszeitraum ab dem dritten Lebensmonat bis zum zehnten Lebensmonat wurde bei *Adck4* defizienten Mäusen eine progrediente Proteinurie, ein Anstieg der Nierenretentionsparameter und ein vermindertes Überleben beobachtet.

Die *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse entwickelten im Alter von vier bis fünf Monaten eine Erkrankung des glomerulären Filters. Albumin geht über den Urin verloren, dies zeigte sich im Anstieg der Albumin-Kreatinin Quotienten und einer Hypoalbuminämie der Mäuse. Der Albumin-Kreatinin-Quotient stieg ab dem fünften Lebensmonat signifikant an und zeigte im zehnten Lebensmonat Werte, die 29-fach über dem Ausgangswert im dritten Lebensmonat liegen. Albumin im Serum der Mäuse sank signifikant ab dem fünften Lebensmonat bis auf 80 % des Ausgangswertes im zehnten Lebensmonat ab.

Ein Fortschreiten der Erkrankung zeigte sich im zunehmenden Funktionsverlust der Glomeruli mit einem Anstieg der Nierenretentionsparameter. Serumharnstoff- und Serumkreatininwerte der nierenerkrankten Mäuse stiegen ab dem siebten Lebensmonat an und verfünffachten sich bis zu einem Alter von zehn Monaten. Erhöhte Phosphatwerte der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse konnten ab einem Alter von neun Monaten nachgewiesen werden, im zehnten Lebensmonat fand eine Verdopplung der Werte im Vergleich zum Ausgangswert bei drei Monaten statt. Der Anstieg von Phosphat im Serum erfolgt erst bei einer fortgeschrittenen Nierenerkrankung und ist damit ein Zeichen für die Schwere der Nierenschädigung. Das Endstadium der Nierenerkrankung zeigte sich mit einem starkem Kreatinin-, Harnstoff- und Phosphat-Anstieg und schließlich auch in einer Verminderung der Urinproduktion. Das Fortschreiten der körperlich zehrenden Erkrankung lässt sich auch in dem Gewichtsverlust von 9 % der *Adck4^{ΔPodozyt}* Tiere zwischen dem sechsten und zehnten Lebensmonat ablesen, die gesunden Tiere nahmen in diesem Alter weiter an Gewicht zu. Der Tod der *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse erfolgte durch das sich entwickelnde terminale Nierenversagen. Anhand der Kaplan-Meier Kurve ließ sich ein verfrühtes Sterben der Tiere ab einem Alter von neun Monaten im Vergleich zu ihren gesunden Artgenossen erkennen.

Die histologische Untersuchung der Mäusenieren erfolgte im zehnten Lebensmonat und zeigte eine globale Glomerulosklerose. In der dieser Arbeit zugehörigen Publikation wurde der Anteil der sklerosierten Glomeruli quantitativ bestimmt und ergab im Durchschnitt 96 % Glomerulosklerose der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse im Vergleich zu unter 5 %

Glomerulosklerose der Kontrolltiere (Widmeier et al., 2020). Da die Erkrankung der *Adck4*^{ΔPodozyt} Mäuse im neunten Lebensmonat schon fortgeschritten war, besteht die Vermutung, dass die für die fokale Glomerulosklerose typische, lokal betonte Sklerosierung einiger Abschnitte des Glomerulus in einem früheren Krankheitsstadium nachzuweisen wäre. Rückblickend wäre daher eine zusätzliche histologische Untersuchung der Nieren von Mäusen mit *Adck4* Mangel im Alter von etwa fünf Monaten interessant gewesen, wenn die Tiere beginnen, klinische Symptome zu entwickeln.

In der Immunfluoreszenzfärbung mit dem podozytenspezifischen Kernprotein WT1 und dem podozytären Marker Nephrin wurde eine lokale und globale Verminderung der Podozyten festgestellt. Die Doppelfärbung mit WT1 und Nephrin wird dazu verwendet die Anzahl von vorhandenen Podozyten im Glomerulus sichtbar zu machen. Die Glomeruli der Wildtypmäuse zeigten eine gleichmäßig verteilte Anfärbung der WT1 positiven Podozytenkerne einhergehend mit einer starken Expression von Nephrin. Dagegen konnten in den Glomeruli der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse nur fokal WT1 positive Kerne nachgewiesen werden. Passend dazu war Nephrin global vermindert exprimiert und vor allem in den Gebieten mit WT1 positiven Kernen detektierbar. Dieses Bild entspricht einer fokalen Glomerulosklerose und bestätigte die Vermutung, dass die Podozyten nicht nur in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, sondern sterben und vermutlich über den Urin verloren gingen. Ebenso konnte bei *Coq6* deletierten Mäusen eine Verminderung der WT1 markierten Zellen und damit der Podozyten festgestellt werden (Widmeier et al., 2019).

5.2 ADCK4 ist essenziell für physiologische Funktionen des Podozyten

Bereits bekannt ist, dass ADCK4 Mangel den Podozyten schädigt und steroid-resistentes nephrotisches Syndrom auslöst (Ashraf et al., 2013), aber die Pathogenese der Erkrankung ist noch weitestgehend unverstanden. In der dieser Arbeit zugehörigen Publikation (Widmeier et al., 2020) wurden die Funktionen und Interaktionen von ADCK4 genauer untersucht.

ADCK4 ist ein mitochondriales Protein, welches stark in den Podozyten exprimiert wird (Ashraf et al., 2013). Bekannt ist ebenso die Interaktion von ADCK4 mit Proteinen, die an der Biosynthese von CoQ₁₀ beteiligt sind (Ashraf et al., 2013). CoQ₁₀ ist ein weiteres wichtiges mitochondriales Protein mit der Funktion der Elektronenübertragung in der Atmungskette und an dessen Biosynthese bisher 16 entdeckte Gene beteiligt sind (Díaz-Casado et al., 2019, Vazquez Fonseca et al., 2018). Es wurde außerdem herausgefunden, dass ADCK4 mit 612 verschiedenen Proteinen interagiert, darunter weitere mitochondriale Proteine wie ATP-Synthase subunit (ATP5L),

Cytochrome c oxidase subunit (COX6A1 und UQCRCQ) und COQ5 (Widmeier et al., 2020). Zusätzlich wurde in kultivierten *ADCK4*-Knockout Podozyten eine verminderte Expression von COQ3, COQ5 und COQ9 festgestellt, alle drei Proteine sind beteiligt an der Synthese von CoQ₁₀ (Widmeier et al., 2020). Ebenfalls wurden in den kultivierten *ADCK4*-Knockout Zellen verminderte Level von CoQ₁₀ gefunden (Widmeier et al., 2020). Passend zu diesen Ergebnissen wurden in Patienten und Patientinnen mit *ADCK4* Mutationen verminderte Spiegel von CoQ₁₀ in Fibroblasten und Lymphoblasten nachgewiesen (Ashraf et al., 2013).

Ein weiteres Zeichen für die mitochondrialen Auswirkungen des *ADCK4* Mangels sind die abnormalen polymorphen Mitochondrien, die sowohl in den Podozyten von Mäusen mit *Adck4*-Mangel als auch in Patienten und Patientinnen mit *ADCK4* Mutationen gefunden wurden (Ashraf et al., 2013, Widmeier et al., 2020). Die Mitochondrien zeigten eine irreguläre Form und eine verminderte Ausbildung der Cristae. Polymorphe Mitochondrien wurden ebenfalls in anderen CoQ₁₀ Mangelerkrankungen gesehen (Diomedi-Camassei et al., 2007, Emma and Salviati, 2017). Zusammenfassend bekräftigen diese Ergebnisse die Vermutung, dass eine verminderte Expression von *ADCK4* zu CoQ₁₀ Mangel führt. Entscheidend ist dabei wohl eher die regulatorische Funktion von *ADCK4* über die Interaktion mit mehreren an der Synthese beteiligten Proteinen, da *ADCK4* nicht direkt an den Syntheseschritten beteiligt ist (Widmeier et al., 2020). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass auch bei völligem Funktionsverlust von *ADCK4* die CoQ₁₀ Synthese noch eingeschränkt vorhanden ist (Vazquez Fonseca et al., 2018), daher steht die Vermutung im Raum, dass die Beteiligung von *ADCK4* an der CoQ₁₀ Synthese teilweise von anderen Genen kompensiert werden kann und dass weitere Funktionen von *ADCK4* ebenfalls an der Entwicklung von SRNS beteiligt sein können.

Die Pathogenese des CoQ₁₀ Mangels wird durch die Reduzierung der Adenosintriphosphat (ATP) -Produktion durch Störungen in der Atmungskette und die vermehrte Bildung von Radikalen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bestimmt (Acosta et al., 2016). Beide Faktoren müssen aber nicht gleichzeitig und im gleichen Ausmaß vorkommen, sondern sind abhängig von Art und Ort der Mutation (Acosta et al., 2016). Es wurde nachgewiesen, dass in kultivierten Podozyten ein schwerer CoQ₁₀ Mangel mit verringerter ATP-Produktion einhergeht, aber nicht mit einem Anstieg von ROS (Acosta et al., 2016). Dagegen ist ein milderer CoQ₁₀ Mangel mit einer vermehrten Bildung von ROS, aber nicht mit reduzierten ATP-Spiegeln assoziiert (Quinzii et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass erhöhte Radikalproduktion gewebespezifisch vorkommen kann. In *Pdss2*-Knockout Mäusen mit SRNS, wurden die vermehrten Radikale nur im Nierengewebe nachgewiesen (Quinzii et al., 2013). Es ist nicht bekannt, ob CoQ₁₀ Mangel in Patienten und Patientinnen mit *ADCK4* Mangel zur verminderten ATP Produktion, zu einer

erhöhten ROS Produktion oder einer Kombination aus beidem führt. Da Podozyten eine hohe Anzahl an Mitochondrien besitzen (Pavenstädt et al., 2003) und die Erhaltung ihrer Funktionen einen hohen Verbrauch von ATP fordert, würde ein ATP Mangel den Zellen schaden und einen Funktionsverlust der Zellen bewirken. Ebenfalls denkbar wäre, dass eine erhöhte Radikalproduktion durch die Fehlfunktion von ADCK4 den Zellstress immer weiter erhöht, bis es zum Zelluntergang kommt. Die ADCK4 Mangelerkrankung scheint sowohl im Mausmodell als auch im Menschen eine progrediente Erkrankung zu sein, welche die affizierten Podozyten für einen gewissen Zeitraum kompensieren können. Ebenfalls zeigen Zellexperimente, dass in *ADCK4*-Knockout Podozyten die Erhöhung des Zellstress durch die Zugabe von Arachidonsäure zur verminderten Zellviabilität im Vergleich zu Kontrollzellen führen (Widmeier et al., 2020).

Unter den Interaktionspartnern von ADCK4 befinden sich auch mit Myosin und Filamin (Widmeier et al., 2020) zwei Proteine, welche wichtige Bestandteile des Zytoskeletts einer Zelle sind. Zusätzlich wurde entdeckt, dass in kultivierten *ADCK4*-Knockout Podozyten Proteine, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind, verringert produziert werden (Widmeier et al., 2020). Dies bekräftigt die Vermutung, dass mitochondriale Dynamiken eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der typischen Form des Podozyten spielen. Ähnlich wie neuronale Zellen benötigen sie eine stetig hohe Energieproduktion, um ihre Form und Funktion aufrecht zu erhalten (Imasawa and Rossignol, 2013).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ADCK4 eine Vielzahl an Interaktionspartnern besitzt und in mehrere physiologische Abläufe der Zelle involviert ist. Vermutlich ist vor allem die Reduzierung von CoQ₁₀ an der Pathogenese des durch ADCK4 Mangel induziertem SRNS durch die Verminderung der ATP Produktion und der verminderten antioxidativen Aktivität beteiligt. Interessant für weitere Untersuchungen ist die Beteiligung von ADCK4 an der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts der Podozyten, da die Form des Podozyten so essenziell für die Erfüllung der Filterfunktion im Glomerulus ist.

5.3 Einordnung der klinischen Manifestation des ADCK4 Mangels im Spektrum der mitochondrialen Erkrankungen

Der Phänotyp der nierenerkrankten Mäuse korrelierte mit dem klinischen Bild der bisher bekannten Patienten und Patientinnen mit *ADCK4* Mutationen. Diese entwickeln durchschnittlich im Alter von 12-13 Jahren ein SRNS, welches in den meisten Fällen in der zweiten bis dritten Lebensdekade zur terminalen Niereninsuffizienz führt (Ashraf et al., 2013, Atmaca et al., 2017,

Korkmaz et al., 2016). Die Erkrankten zeigen gelegentlich neurologische Symptome wie Krampfanfälle, leichte Intelligenzminderung und Verhaltensauffälligkeiten. Mutationen in *ADCK4* zählen zur Untergruppe der mitochondrialen Erkrankungen der SRNS auslösenden Gene (**Tabelle 1**, Kapitel 1.2.4).

Mitochondriale Erkrankungen sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die in jedem Alter auftreten und jedes Organ betreffen können. Störungen in den Mitochondrien führen zu einer verminderten Energieproduktion in den Zellen. Daher treten die Symptome vor allem in Organen mit einem hohen Energieumsatz auf, wie das zentrale Nervensystem, die Skelettmuskulatur, das Herz, die Cochlea und die Retina (Davis et al., 2017: 130ff.). Die klinische Präsentation der Patienten und Patientinnen ist dementsprechend divers, es können Symptome wie Enzephalopathien, Retinopathien, Taubheit, Herzrhythmusstörungen, Diabetes mellitus, Leberinsuffizienz, Neuropathien, Muskelschmerzen und -schwäche und Rhabdomyolysen mit ggf. resultierender Nierenschädigung auftreten (Davis et al., 2017: 130ff.).

Oft finden sich genetische Mutationen als Ursache für die mitochondrialen Erkrankungen. Bisher wurden vier Gene entdeckt, die neben für mitochondriale Erkrankungen typischen Symptomkomplexen auch einen renal betonten Phänotyp zeigen (**Tabelle 1**, Kapitel 1.2.4). Darunter zählen Mutationen des *PDSS2* Gens, die sowohl FSGS auch das Leigh Syndrom hervorrufen (López et al., 2006). Das Leigh Syndrom wird auch als subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie bezeichnet und führt vor allem zu Störungen der motorischen Zentren des zentralen Nervensystems, des Kleinhirns und des Hirnstamms. Mutationen des *MTTL1* Gens lösen neben FSGS das MELAS Syndrom aus (Rudnicki et al., 2016). Diese Abkürzung steht für die Kombination von Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden. *COQ2* löst mutiert Early-onset SRNS aus und geht mit weiteren verschiedenen Symptomen aus dem mitochondrialen Spektrum einher (Diomedì-Camassei et al., 2007). Dagegen resultieren aus Mutationen im *COQ6* Gen ein Early-onset SRNS in Kombination mit Taubheit (Heeringa et al., 2011). Genmutationen in *COQ2*, *COQ6* und *PDSS2* gehen ebenfalls mit erniedrigten CoQ₁₀ Spiegel einher (Diomedì-Camassei et al., 2007, Heeringa et al., 2011, López et al., 2006).

Unter den mitochondrialen Erkrankungen zeigen *ADCK4* Mutationen den selektivsten renalen Phänotyp (Korkmaz et al., 2016). Eine Erklärung dafür könnte die selektiv starke Expression von *ADCK4* in den Podozyten der Glomeruli sein (Ashraf et al., 2013). Auch fällt auf, dass sich die *ADCK4* Mangelerkrankung im Vergleich zum *COQ6* und *COQ2* assoziiertem Early-onset SRNS durchschnittlich eine Dekade später manifestiert. Auch der Verlauf des podozytenspezifischen Knockouts von *Adck4* im Tiermodell zeigte eine relativ spät beginnende und langsam progrediente

Nierenschädigung. Vermutlich wird die durch Mutationen im *ADCK4* Gen ausgelöste Erkrankung von den Podozyten eine Zeit lang kompensiert und es kommt erst durch eine Akkumulation von Noxen und dysfunktionalen Zellabläufen zur Zellschädigung. Wie in Kapitel 5.2 erläutert, ist *ADCK4* an mehreren verschiedenen physiologischen Abläufen der Zelle beteiligt (Widmeier et al., 2020) und wirkt eher indirekt an der Biosynthese von CoQ₁₀ mit (Ashraf et al., 2013). Über die Funktion der Proteine COQ2 und COQ6 ist ihre direkte Beteiligung an der Biosynthese von CoQ₁₀ bekannt (Diomedici-Camassei et al., 2007, Heeringa et al., 2011). Daher könnte eine durch Mutationen hervorgerufene Fehlfunktion dieser Proteine zu einem stärker ausgeprägten CoQ₁₀-Mangel und damit einhergehenden schneller einsetzenden Funktionsverlust der Zellen führen als es in der *ADCK4* Mangelkrankung der Fall wäre.

5.4 Die durch *Adck4* Mangel induzierte Dysfunktion der Podozyten löste eine Aktivierung von Mesangiumzellen aus und beeinflusste die Synthese der Basalmembran im Mausmodell

SRNS wird als Erkrankung des Podozyten beschrieben (Wiggins, 2007). Der Podozyt lebt in enger Verbindung mit unterschiedlichen Zellarten. Wie schon in Kapitel 1.1.1 erwähnt, ist die Kommunikation und Zusammenarbeit der verschiedenen Zellen des Glomerulus essenziell für die Funktion des glomerulären Filters (Pollak et al., 2014). Daher stellt sich die Frage, ob und wie andere Zellarten in der nächsten Umgebung auf die Dysfunktion der Podozyten reagieren.

Der Myelofibroblastenmarker α SMA ist im Glomerulus ein sehr gut etablierter und spezifischer Marker für aktivierte Mesangiumzellen und war in den Glomeruli der Kontrolltiere nicht exprimiert. Dagegen war α SMA in den zehn Monate alten *Adck4*^{*ΔPodozyt*} Mäusen stark erhöht. Daraus lässt sich ableiten, dass durch die Schädigung der Podozyten durch *Adck4* Mangel eine Aktivierung der Mesangiumzellen stattfand. Dies lässt vermuten, dass dysfunktionale Podozyten andere Zellen in ihrer Umgebung beeinflussen und Zellreaktionen hervorrufen.

In Mäusen mit Coq6 Mangel, ein weiteres SRNS auslösendes Gen des Mitochondriums, konnte ebenfalls eine Vermehrung des Myelofibroblastenmarker α SMA festgestellt werden (Widmeier et al., 2019). Daher scheint die Aktivierung der Mesangiumzellen bei podozytärer Schädigung nicht genspezifisch abgelaufen zu sein. Interessant wäre es zu sehen in welcher zeitlichen Abfolge die Aktivierung der Mesangiumzellen mit der podozytären Schädigung auftrat. Da die Immunfluoreszenzfärbung im Alter von zehn Monaten durchgeführt wurde, war der Schaden am Glomerulus schon weit fortgeschritten und es könnte sein, dass die mesangiale Aktivierung eine

letzte Stressreaktion eines kollabierenden Systems war. Es könnte aber auch sein, dass die Mesangiumzellen schon früher aktiviert wurden und über ihren veränderten Metabolismus zum Krankheitsgeschehen beitragen.

Bereits bekannt ist, dass Erkrankungen des Mesangiums wie die IgA-Nephropathie über von den Mesangiumzellen ausgehende Signalwege zur Dysfunktion und schließlich zum Verlust von Podozyten führen (Trimarchi and Coppo, 2019). Daher ist anzunehmen, dass auch die Kommunikation von Podozyten zu Mesangiumzellen und wieder zurück stattfinden könnte.

Ein weiterer Fund für die Auswirkungen der podozytären Dysfunktion auf weitere Bestandteile des Glomerulus war die veränderte Expression des Basalmembranmarkers Nidogen in den Glomeruli der *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäuse. Podozyten synthetisieren zusammen mit den glomerulären Endothelzellen die Proteine der Basalmembran (Fissell and Miner, 2018). Anhand der Immunfluoreszenzbilder lässt sich ableiten, dass dysfunktionale Podozyten den Aufbau der glomerulären Basalmembran stören. In früheren Publikationen wurde über den Crosstalk zwischen Podozyten und Endothelzellen berichtet, welcher ebenfalls in der Entwicklung von FSGS eine Rolle spielt (Daehn et al., 2014). Podozyten halten über Signalwege und Sekretion von angiogenen Faktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die glomerulären Endothelzellen am Leben, aber können bei Dysfunktion auch oxidativen Stress in den Mitochondrien der Endothelzellen auslösen (Daehn et al., 2014). Die dadurch ausgelöste endotheliale Fehlfunktion sorgt für einen vermehrten Verlust von Podozyten und damit eine Verschlechterung des Krankheitsbildes der FSGS (Daehn et al., 2014).

Obwohl der Einfluss der dysfunktionalen Podozyten auf weitere Zellen des Glomerulus nicht im Fokus dieser Arbeit stand und noch weiterer Investigation bedarf, lassen die oben beschriebenen Funde der Immunfluoreszenzfärbungen die Vermutung zu, dass die durch podozytären *Adck4* Mangel ausgelöste Glomerulopathie neben Schädigung der Podozyten auch Signalkaskaden in den Mesangiumzellen hervorrief, dort zu einem phänotypischen Wandel/Aktivierung führte und die Synthese der Basalmembran beeinflusste. Auch wenn der Ursprung der Erkrankung in den Podozyten zu finden ist, könnte eine Unterbrechung der Signalwege zu anderen Zellen des Glomerulus und folglich ihrer Beteiligung am Krankheitsgeschehen einen positiven Einfluss auf die Krankheitsentwicklung haben.

5.5 Männliche *Adck4*-Knockout Mäuse entwickelten ein früher einsetzendes und stärker ausgeprägtes chronisches Nierenversagen als weibliche *Adck4*-Knockout Mäuse

Bei der genauen Analyse der Ergebnisse der Studie fiel auf, dass weibliche und männliche Tiere unterschiedlich stark auf den Knockout des *Adck4* Gens reagierten. Das Geschlecht der Tiere hatte Einfluss auf ihr Überleben, die Entwicklung von Proteinurie und ihre Nierenretentionswerte unter *Adck4* Mangel.

Wie schon in Kapitel 5.1 genauer beschrieben, ist die vermehrte Albuminausscheidung über den Urin das erste klinische Zeichen der glomerulären Erkrankung der Tiere. Sowohl die weiblichen als auch die männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse entwickelten ab dem vierten bis fünften Lebensmonat eine persistierende Proteinurie. Daher trat die initiale Schädigung des glomerulären Filters durch den Mangel von *Adck4* in beiden Geschlechtern zum gleichen Zeitpunkt auf. Dennoch zeigten die männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse deutlich höhere Werte des Albumin/Kreatinin-Quotienten und erfuhren daher eine stärkere Schädigung der Podozyten als ihre weiblichen Artgenossen. Auch die Analyse des Verlaufs von Serumkreatinin und Serumharnstoff bekräftigt den schwereren Krankheitsverlauf der männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Tiere. Die männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Mäuse präsentierten ab dem siebten Lebensmonat einen starken Anstieg der Nierenretentionsparameter bis auf das fast Siebenfache des Ausgangswertes des Serumkreatinins und das Achtfache des Ausgangswertes des Serumharnstoffes. Dagegen zeigten die Werte der weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Tiere einen nicht signifikanten Anstieg dieser Werte im zehnten Lebensmonat. Zusätzlich entwickelten die männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse eine stärkere Hypoalbuminämie und Hyperphosphatämie. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Tiere die initiale glomeruläre Schädigung besser kompensieren und länger eine ausreichend stabile Nierenfunktion erhalten konnten als ihre männlichen Artgenossen. Des Weiteren zeigte die Analyse des Gewichts der Tiere, dass die weiblichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse sich in einer besseren körperlichen Verfassung befanden. Während das Gewicht der weiblichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* keinen großen Schwankungen unterlag, verloren die männlichen *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{fllox/fllox}* Tiere ab dem siebten bis zum zehnten Lebensmonat 16 % ihres Maximalgewichts.

Ein deutlicher Unterschied wurde in der Auswertung der Lebenserwartung der beiden Geschlechter sichtbar. Die männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse begannen im Alter von 9,1 Monaten zu versterben, innerhalb der nächsten zwei Monate verstarben 86 % der männlichen *Adck4^{ΔPodozyt}* Mäuse. Dagegen starb die erste weibliche *Adck4^{ΔPodozyt}* Maus im Alter von 10,3 Monaten und bis

zum Ende des zehnten Lebensmonats waren lediglich 25 % der weiblichen *Adck4*^{ΔPodozyt} Mäuse verstorben. Im Median überlebten die männlichen *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{fllox/fllox} Tiere 10,1 Monate, die weiblichen *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{fllox/fllox} Tiere kamen auf ein medianes Überleben von 17 Monaten (Medianes Überleben der weiblichen Tiere wurde über die ganzen Spanne des Experimentes von drei bis 18 Monaten bestimmt (Widmeier et al., 2020)). Daher überlebten die weiblichen *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{fllox/fllox} Mäuse im Median 6,9 Monate länger als die männlichen *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{fllox/fllox} Mäuse, dennoch überlebten sie kürzer als ihre Kontrollwurfgeschwister (Widmeier et al., 2020). Die in einem Alter von 18 Monaten noch lebenden *Adck4*-Knockout Tiere wiesen alle ein weibliches Geschlecht auf (Widmeier et al., 2020).

Daher lässt sich schlussfolgern, dass weibliche *Nphs2.Cre*⁺;*Adck4*^{fllox/fllox} Mäuse später eine progressive Nierenerkrankung entwickelten, welche aber schließlich ebenfalls zum Nierenversagen und verfrühten Tod der Tiere führte.

Ebenfalls wurde in der Untersuchung von Mäusen mit *Coq6* Mangel beobachtet, dass männliche *Coq6*^{ΔPodozyt} Mäuse eine stärkere Proteinurie als weibliche *Coq6*^{ΔPodozyt} Mäuse entwickelten (Widmeier et al., 2019). Weshalb weibliche Tiere schwächer auf die genetische Schädigung reagieren, blieb ebenfalls unklar. Andere Studien zeigen, dass weibliche Mäuse experimentell induzierte Krankheiten und Schäden wie Ischämie-Reperfusionsschaden, Transplantatabstoßung und Sepsis besser kompensieren können (Angele et al., 2014, Hu et al., 2009, Kotimaa et al., 2016). Ursächlich wird angenommen, dass Komponenten des Immunsystems wie zum Beispiel das Komplementsystems in Mäusen sexualhormonabhängig aktiviert werden und damit eine niedrigere Aktivität in weiblichen Tieren besitzen (Kotimaa et al., 2016). Durch den *Adck4* Mangel in den Podozyten werden vermehrt Radikale produziert und vermindert ATP generiert (Acosta et al., 2016, Widmeier et al., 2020). Dies führt zur Zellschädigung und verändert damit den Zellmetabolismus. Dadurch könnten Immunzellen vermehrt aktiviert werden und zur Entzündungsreaktion und dem Fortschreiten der glomerulären Krankheit beitragen. Daher könnten androgenabhängige aktivierte Komponenten des Immunsystems der männlichen Mäuse (Kotimaa et al., 2016) zum früher einsetzenden chronischen Nierenversagen der Tiere beitragen. Ebenso beeinflusst die Schädigung der Podozyten die Aktivität der anderen umgebenden Zellen des Glomerulus (siehe Kapitel 5.4). Die Aktivierung der Nachbarzellen könnte in beiden Geschlechtern unterschiedlich ablaufen.

Bislang wurden in der Patientenkohorte mit *ADCK4* Mutationen keine Unterschiede im Erkrankungsalter abhängig des Geschlechts beobachtet (Ashraf et al., 2013, Korkmaz et al., 2016, Vazquez Fonseca et al., 2018). Daher scheint es sich bei den Unterschieden der Geschlechter um

eine Spezies und Modell bezogene Auffälligkeit zu handeln. Dennoch würde das Wissen um protektive und die Krankheit verschlimmernde Faktoren zum Krankheitsverständnis beitragen. Zu beachten ist, dass die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe mit sieben bis neun Tieren limitiert ausfällt. Zur genaueren Investigation des Krankheitsverlaufs der weiblichen und männlichen *Adck4*^{APodozyt} Mäusen wären Überlebensbiopsien der Nieren zu mehreren früheren Zeitpunkten interessant gewesen, um das unterschiedliche Fortschreiten der Nierenerkrankung auch histologisch beurteilen zu können.

5.6 CoQ₁₀ Mangel als potenziell behandelbare Erkrankung

Eine der wichtigen Funktionen von CoQ₁₀ ist die Elektronenübertragung in der Atmungskette zwischen den Komplexen I (NADH-ubiquinone oxireductase), II (Succinate-ubiquinone oxireductase) und III (Succinate-cytochrome c oxireductase) (Díaz-Casado et al., 2019). Zusätzlich hat CoQ₁₀ die Fähigkeit Lipidperoxyl-Radikale (LOO*) abzufangen (Forsmark-Andrée et al., 1995) und damit mitochondriale DNA vor oxidativen Schäden zu schützen (Forsmark-Andrée and Ernster, 1994).

CoQ₁₀ Mangelerkrankungen sind eine seltene und vielfältige Gruppe von Krankheiten. Genetische Ursachen der Erkrankung sind Mutationen der in der Biosynthese von CoQ₁₀ beteiligten Gene. Bisher entdeckt wurden Mutationen in *PDSS1* (Mollet et al., 2007), *PDSS2* (López et al., 2006), *CoQ2* (Diomed-Camassei et al., 2007), *CoQ6* (Heeringa et al., 2011), *CoQ7* (Wang et al., 2017), *CoQ4* (Sondheimer et al., 2017), *CoQ5* (Malicdan et al., 2018), *CoQ8A* (Lagier-Tourenne et al., 2008), *CoQ8B/ADCK4* (Ashraf et al., 2013), *CoQ9* (Duncan et al., 2009).

Die erfolgreiche Anwendung der Substitution von CoQ₁₀ bei CoQ₁₀ Mangelerkrankungen wurde bereits publiziert (Ashraf et al., 2013, Heeringa et al., 2011, Korkmaz et al., 2016, Montini et al., 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Substitution mit der 2,4-Dihydroxybenzoesäure (2,4-diHB) im Vergleich zu anderen Metaboliten von CoQ₁₀ die stärkste Wirkung zeigt (Wang and Hekimi, 2016, Widmeier et al., 2019). Weitere Vorteile der Verwendung von 2,4-diHB sind die bessere Absorption im Vergleich zu CoQ₁₀ und die bereits getestete sichere Anwendung in der Lebensmittelindustrie (Wang and Hekimi, 2016).

Diese Arbeit ist Teil der Mäusestudie zur Untersuchung der Behandlung von *Adck4*-Knockout Mäusen mit 2,4-diHB von Widmeier et al., 2020. Die Therapie der Mäuse wurde im Alter von drei Monaten begonnen. Die Ergebnisse zeigten ein verlängertes Überleben der behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Knockout Mäusen (Widmeier et al., 2020). Ebenso wurde eine verbesserte Nierenfunktion und eine altersentsprechende Histologie der mit 2,4-diHB therapierten

Tiere im Vergleich zu den *Adck4*^{ΔPodozyt} Mäusen festgestellt. Gleichzeitig wurden keine negativen Effekte bei den Wildtyptieren, die ebenfalls mit 2,4-diHB behandelt wurden, beobachtet. Interessanterweise offenbarte die Untersuchung der Nieren der *Adck4*^{ΔPodozyt} Mäuse mit 2,4-diHB Therapie im Vergleich zu den gesunden Wurfkontrollgeschwistern eine normale Podozytenmorphologie mit lediglich einer verringerten Schlitzmembranfrequenz und einer geringeren Expression von Synaptopodin. Dennoch zeigten die Mäuse klinisch weiterhin eine Proteinurie bei gleicher Überlebensrate wie die Wurfkontrollgeschwister. Durch die Verwendung von 2,4-diHB wurde das Voranschreiten der Erkrankung signifikant verringert, aber nicht vollständig behoben. Ein Grund hierfür könnten eine Fehlfunktionen von Adck4 sein, welche nicht durch die Behandlung mit 2,4-diHB verbessert werden konnte. Vermutlich haben Mutationen im *ADCK4* Gen Einfluss auf den Aktin-basierenden Teil des Zytoskeletts der Podozyten (Widmeier et al., 2020). Die mittels Phalloidin Färbung sichtbaren Aktin enthaltenen Zellareale der *ADCK4*-Knockout Podozyten zeigten sich verkleinert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Größe dieser Zellbereiche ließ sich jedoch nicht durch die Zugabe von 2,4-diHB ändern (Widmeier et al., 2020).

Die Mäusestudie zur Behandlung von Coq6 defizienten Mäusen mit 2,4-diHB zeigte ebenfalls einen signifikanten Rückgang der Nierenretentionsparameter, eine altersentsprechende Histologie der Mäusenieren sowie eine klinische Besserung der Nierenerkrankung (Widmeier et al., 2019). In dieser Studie gab es zwar eine numerische Tendenz zur Proteinurie und einer Verringerung der Schlitzmembranfrequenz der mit 2,4-diHB behandelten *Coq6*^{ΔPodozyt} Mäuse, jedoch im Vergleich zu den mit 2,4-diHB behandelten *Adck4*^{ΔPodozyt} Mäusen konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Die Behandlung der Mäuse mit 2,4-diHB wurde im Alter von fünf Monaten begonnen und es konnte nicht nur eine Verhinderung der Ausbildung der Nierenerkrankung, sondern auch ein Rückgang der Proteinurie ab dem Zeitpunkt der Behandlung festgestellt werden (Widmeier et al., 2019). Der Vergleich dieser beiden Studien führt zu der Vermutung, dass die *Coq6*^{ΔPodozyt} Mäuse besser auf die Behandlung mit 2,4-diHB angesprochen haben und dass der Mangel von Coq6 in den Podozyten hauptsächlich zur CoQ₁₀ Defizienz führte. Dagegen wird die Vermutung bestärkt, dass Adck4 durch verschiedene Funktionen im Podozyten wirkte und diese nicht alle durch die Substitution von 2,4-diHB behandelt werden konnten.

Nach einer erfolgreich getesteten Therapie im Mausmodell erfolgt die Übertragung dieser Therapie auf die Anwendung im Menschen. Studien zeigen den Effekt von CoQ₁₀ Supplementierung bei Patienten und Patientinnen mit *ADCK4* Mutationen (Atmaca et al., 2017, Atmaca et al., 2019). Dafür wurden 28 Personen aus elf Familien mit homozygoten *ADCK4* Mutationen identifiziert. Alle Erkrankten hatten Albuminurie, 18 eine chronische

Nierenerkrankung und sechs davon eine terminale Nierenerkrankung. Besonders interessant waren die acht Patienten und Patientinnen, bei denen ein ADCK4 Mangel im klinischen Stadium einer asymptomatischen Proteinurie entdeckt wurde. Bei diesen Patienten und Patientinnen konnte der Effekt einer frühzeitigen Supplementierung mit oralen CoQ₁₀ beobachtet werden. Durchschnittlich wurden die Erkrankten über 11,5 Monate betreut, in dieser Zeit konnte eine signifikante Verringerung der Proteinurie und eine Stabilisierung der eGFR erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass CoQ₁₀ Supplementierung an sich als auch Supplementierung mit unnatürlichen Vorläuferverbindungen wie 2,4-diHB vor allem im frühen Stadium suffizient sind, da Schäden an den Nieren verhindert werden, jedoch nicht rückgängig gemacht werden können (Atmaca et al., 2019, Korkmaz et al., 2016, Montini et al., 2008). Die frühzeitige Erkennung der Krankheit ist eine wichtige und schwierige Aufgabe, da die Therapie am besten im asymptomatischen Stadium der Erkrankung begonnen werden sollte. Dies betont ebenfalls die Wichtigkeit einer ausgedehnten genetischen Diagnostik, um die Progression zur terminalen Nierenerkrankung durch frühzeitige Supplementierung zu verhindern. Nichtsdestoweniger zeigen diese Studien den hohen Wert eines weitreichenden Verständnisses eines renalen Krankheitsgeschehens, um zu einer hochspezifischen und nebenwirkungsarmen Therapie eines SRNS beim Menschen zu gelangen.

6. Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 269(2), pp. 192-200.
- Abrahamson, D. R. (2012). Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM. *Semin Nephrol*, 32(4), pp. 342-9.
- Acosta, M. J., Vazquez Fonseca, L., Desbats, M. A., Cerqua, C., Zordan, R., Trevisson, E. and Salviati, L. (2016). Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8), pp. 1079-1085.
- Akilesh, S., Suleiman, H., Yu, H., Stander, M. C., Lavin, P., Gbadegesin, R., Antignac, C., Pollak, M., Kopp, J. B., Winn, M. P. and Shaw, A. S. (2011). Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest*, 121(10), pp. 4127-37.
- Angele, M. K., Pratschke, S., Hubbard, W. J. and Chaudry, I. H. (2014). Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*, 5(1), pp. 12-9.
- Ashraf, S., Gee, H. Y., Woerner, S., Xie, L. X., Vega-Warner, V., Lovric, S., Fang, H., Song, X., Cattran, D. C., Avila-Casado, C., Paterson, A. D., Nitschke, P., Bole-Feysot, C., Cochat, P., Esteve-Rudd, J., Haberberger, B., Allen, S. J., Zhou, W., Airik, R., Otto, E. A., Barua, M., Al-Hamed, M. H., Kari, J. A., Evans, J., Bierzynska, A., Saleem, M. A., Bockenbauer, D., Kleta, R., El Desoky, S., Hacıhamdioglu, D. O., Gok, F., Washburn, J., Wiggins, R. C., Choi, M., Lifton, R. P., Levy, S., Han, Z., Salviati, L., Prokisch, H., Williams, D. S., Pollak, M., Clarke, C. F., Pei, Y., Antignac, C. and Hildebrandt, F. (2013). ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*, 123(12), pp. 5179-89.
- Ashraf, S., Kudo, H., Rao, J., Kikuchi, A., Widmeier, E., Lawson, J. A., Tan, W., Hermle, T., Warejko, J. K., Shril, S., Airik, M., Jobst-Schwan, T., Lovric, S., Braun, D. A., Gee, H. Y., Schapiro, D., Majmundar, A. J., Sadowski, C. E., Pabst, W. L., Daga, A., van der Ven, A. T., Schmidt, J. M., Low, B. C., Gupta, A. B., Tripathi, B. K., Wong, J., Campbell, K., Metcalfe, K., Schanze, D., Niihori, T., Kaito, H., Nozu, K., Tsukaguchi, H., Tanaka, R., Hamahira, K., Kobayashi, Y., Takizawa, T., Funayama, R., Nakayama, K., Aoki, Y.,

- Kumagai, N., Iijima, K., Fehrenbach, H., Kari, J. A., El Desoky, S., Jalalah, S., Bogdanovic, R., Stajić, N., Zappel, H., Rakhmetova, A., Wassmer, S. R., Jungraithmayr, T., Strehlau, J., Kumar, A. S., Bagga, A., Soliman, N. A., Mane, S. M., Kaufman, L., Lowy, D. R., Jairajpuri, M. A., Lifton, R. P., Pei, Y., Zenker, M., Kure, S. and Hildebrandt, F. (2018). Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun*, 9(1), pp. 1960.
- Assady, S., Wanner, N., Skorecki, K. L. and Huber, T. B. (2017). New Insights into Podocyte Biology in Glomerular Health and Disease. *J Am Soc Nephrol*, 28(6), pp. 1707-1715.
- Atmaca, M., Gülhan, B., Atayar, E., Bayazit, A. K., Candan, C., Arıcı, M., Topaloğlu, R. and Özaltın, F. (2019). Long-term follow-up results of patients with ADCK4 mutations who have been diagnosed in the asymptomatic period: effects of early initiation of CoQ10 supplementation. *Turk J Pediatr*, 61(5), pp. 657-663.
- Atmaca, M., Gulhan, B., Korkmaz, E., Inozu, M., Soylemezoglu, O., Candan, C., Bayazit, A. K., Elmacı, A. M., Parmaksiz, G., Duzova, A., Besbas, N., Topaloglu, R. and Ozaltin, F. (2017). Follow-up results of patients with ADCK4 mutations and the efficacy of CoQ10 treatment. *Pediatr Nephrol*, 32(8), pp. 1369-1375.
- Azushima, K., Gurley, S. B. and Coffman, T. M. (2018). Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nat Rev Nephrol*, 14(1), pp. 48-56.
- Bierzynska, A., McCarthy, H. J., Soderquest, K., Sen, E. S., Colby, E., Ding, W. Y., Nabhan, M. M., Kerecuk, L., Hegde, S., Hughes, D., Marks, S., Feather, S., Jones, C., Webb, N. J., Ognjanovic, M., Christian, M., Gilbert, R. D., Sinha, M. D., Lord, G. M., Simpson, M., Koziell, A. B., Welsh, G. I. and Saleem, M. A. (2017). Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int*, 91(4), pp. 937-947.
- Boerkoel, C. F., Takashima, H., John, J., Yan, J., Stankiewicz, P., Rosenbarker, L., André, J. L., Bogdanovic, R., Burguet, A., Cockfield, S., Cordeiro, I., Fründ, S., Illies, F., Joseph, M., Kaitila, I., Lama, G., Loirat, C., McLeod, D. R., Milford, D. V., Petty, E. M., Rodrigo, F., Saraiva, J. M., Schmidt, B., Smith, G. C., Spranger, J., Stein, A., Thiele, H., Tizard, J., Weksberg, R., Lupski, J. R. and Stockton, D. W. (2002). Mutant chromatin remodeling

- protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nat Genet*, 30(2), pp. 215-20.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M. C., Niaudet, P. and Antignac, C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24(4), pp. 349-54.
- Braun, D. A., Lovric, S., Schapiro, D., Schneider, R., Marquez, J., Asif, M., Hussain, M. S., Daga, A., Widmeier, E., Rao, J., Ashraf, S., Tan, W., Lusk, C. P., Kolb, A., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J. M., Hoogstraten, C. A., Eddy, K., Kitzler, T. M., Shril, S., Moawia, A., Schrage, K., Khayyat, A. I. A., Lawson, J. A., Gee, H. Y., Warejko, J. K., Hermle, T., Majmundar, A. J., Hugo, H., Budde, B., Motameny, S., Altmüller, J., Noegel, A. A., Fathy, H. M., Gale, D. P., Waseem, S. S., Khan, A., Kerecuk, L., Hashmi, S., Mohebbi, N., Ettenger, R., Serdaroğlu, E., Alhasan, K. A., Hashem, M., Goncalves, S., Ariceta, G., Ubetagoyena, M., Antonin, W., Baig, S. M., Alkuraya, F. S., Shen, Q., Xu, H., Antignac, C., Lifton, R. P., Mane, S., Nürnberg, P., Khokha, M. K. and Hildebrandt, F. (2018). Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 128(10), pp. 4313-4328.
- Braun, D. A., Rao, J., Mollet, G., Schapiro, D., Dageron, M. C., Tan, W., Gribouval, O., Boyer, O., Revy, P., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J. M., Lawson, J. A., Schanze, D., Ashraf, S., Ullmann, J. F. P., Hoogstraten, C. A., Boddaert, N., Collinet, B., Martin, G., Liger, D., Lovric, S., Furlano, M., Guerrera, I. C., Sanchez-Ferras, O., Hu, J. F., Boschhat, A. C., Sanquer, S., Menten, B., Vergult, S., De Rocker, N., Airik, M., Hermle, T., Shril, S., Widmeier, E., Gee, H. Y., Choi, W. I., Sadowski, C. E., Pabst, W. L., Warejko, J. K., Daga, A., Basta, T., Matejas, V., Scharmann, K., Kienast, S. D., Behnam, B., Beeson, B., Begtrup, A., Bruce, M., Ch'ng, G. S., Lin, S. P., Chang, J. H., Chen, C. H., Cho, M. T., Gaffney, P. M., Gipson, P. E., Hsu, C. H., Kari, J. A., Ke, Y. Y., Kiraly-Borri, C., Lai, W. M., Lemyre, E., Littlejohn, R. O., Masri, A., Moghtaderi, M., Nakamura, K., Ozaltin, F., Praet, M., Prasad, C., Prytula, A., Roeder, E. R., Rump, P., Schnur, R. E., Shiihara, T., Sinha, M. D., Soliman, N. A., Soulami, K., Sweetser, D. A., Tsai, W. H., Tsai, J. D., Topaloglu, R., Vester, U., Viskochil, D. H., Vatanavicharn, N., Waxler, J. L., Wierenga, K. J., Wolf, M. T. F., Wong, S. N., Leidel, S. A., Truglio, G., Dedon, P. C., Poduri, A., Mane, S., Lifton, R. P., Bouchard, M., Kannu, P., Chitayat, D., Magen, D., Callewaert, B., van Tilbeurgh,

- H., Zenker, M., et al. (2017). Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat Genet*, 49(10), pp. 1529-1538.
- Braun, D. A., Sadowski, C. E., Kohl, S., Lovric, S., Astrinidis, S. A., Pabst, W. L., Gee, H. Y., Ashraf, S., Lawson, J. A., Shril, S., Airik, M., Tan, W., Schapiro, D., Rao, J., Choi, W. I., Hermle, T., Kemper, M. J., Pohl, M., Ozaltin, F., Konrad, M., Bogdanovic, R., Büscher, R., Helmchen, U., Serdaroglu, E., Lifton, R. P., Antonin, W. and Hildebrandt, F. (2016). Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 48(4), pp. 457-65.
- Braun, D. A., Warejko, J. K., Ashraf, S., Tan, W., Daga, A., Schneider, R., Hermle, T., Jobst-Schwan, T., Widmeier, E., Majmundar, A. J., Nakayama, M., Schapiro, D., Rao, J., Schmidt, J. M., Hoogstraten, C. A., Hugo, H., Bakkaloglu, S. A., Kari, J. A., El Desoky, S., Daouk, G., Mane, S., Lifton, R. P., Shril, S. and Hildebrandt, F. (2019). Genetic variants in the LAMA5 gene in pediatric nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 34(3), pp. 485-493.
- Brown, E. J., Schlöndorff, J. S., Becker, D. J., Tsukaguchi, H., Tonna, S. J., Uscinski, A. L., Higgs, H. N., Henderson, J. M. and Pollak, M. R. (2010). Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 42(1), pp. 72-6.
- Colin, E., Huynh Cong, E., Mollet, G., Guichet, A., Gribouval, O., Arrondel, C., Boyer, O., Daniel, L., Gubler, M. C., Ekinci, Z., Tsimaratos, M., Chabrol, B., Boddaert, N., Verloes, A., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Ferré, M., Procaccio, V., Richard, L., Funalot, B., Moncla, A., Bonneau, D. and Antignac, C. (2014). Loss-of-function mutations in WDR73 are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome. *Am J Hum Genet*, 95(6), pp. 637-48.
- Conti, S., Perico, L., Grahammer, F. and Huber, T. B. (2017). The long journey through renal filtration: new pieces in the puzzle of slit diaphragm architecture. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 26(3), pp. 148-153.
- Coons, A. H. (1961). The beginnings of immunofluorescence. *J Immunol*, 87pp. 499-503.
- Daehn, I., Casalena, G., Zhang, T., Shi, S., Fenninger, F., Barasch, N., Yu, L., D'Agati, V., Schlöndorff, D., Kriz, W., Haraldsson, B. and Bottinger, E. P. (2014). Endothelial

- mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest*, 124(4), pp. 1608-21.
- Davis, R. L., Liang, C., M. and Sue, C. M. (2018): Mitochondrial diseases, in: Aminoff, M.J., Boller, F., Swaab, D. F., ed., *Handbook of Clinical Neurology*. 3. ed., Cambridge, MA: Elsevier B.V., pp.125-141.
- Deen, W. M., Lazzara, M. J. and Myers, B. D. (2001). Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(4), pp. F579-96.
- Díaz-Casado, M. E., Quiles, J. L., Barriocanal-Casado, E., González-García, P., Battino, M., López, L. C. and Varela-López, A. (2019). The Paradox of Coenzyme Q(10) in Aging. *Nutrients*, 11(9), pp.
- Dibbens, L., Schwake, M., Saftig, P. and Rubboli, G. (2016). SCARB2/LIMP2 deficiency in action myoclonus-renal failure syndrome. *Epileptic Disord*, 18(S2), pp. 63-72.
- Dilucca, M., Cimini, G. and Giansanti, A. (2018). Essentiality, conservation, evolutionary pressure and codon bias in bacterial genomes. *Gene*, 663pp. 178-188.
- Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F. M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G. M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., Muda, A. O., Valente, M. L., Bertini, E. and Emma, F. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol*, 18(10), pp. 2773-80.
- Downie, M. L., Gallibois, C., Parekh, R. S. and Noone, D. G. (2017). Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management. *Paediatr Int Child Health*, 37(4), pp. 248-258.
- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., López, L. C., Hirano, M., Quinzii, C. M., Sadowski, M. I., Hardy, J., Singleton, A., Clayton, P. T. and Rahman, S. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet*, 84(5), pp. 558-66.

- Ebarasi, L., Ashraf, S., Bierzynska, A., Gee, H. Y., McCarthy, H. J., Lovric, S., Sadowski, C. E., Pabst, W., Vega-Warner, V., Fang, H., Koziell, A., Simpson, M. A., Dursun, I., Serdaroglu, E., Levy, S., Saleem, M. A., Hildebrandt, F. and Majumdar, A. (2015). Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 96(1), pp. 153-61.
- Emma, F. and Salviati, L. (2017). Mitochondrial cytopathies and the kidney. *Nephrol Ther*, 13 Suppl 1pp. S23-s28.
- Epstein, C. J., Sahud, M. A., Piel, C. F., Goodman, J. R., Bernfield, M. R., Kushner, J. H. and Ablin, A. R. (1972). Hereditary macrothrombocytopathia, nephritis and deafness. *Am J Med*, 52(3), pp. 299-310.
- Ernster, L. and Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, 1271(1), pp. 195-204.
- Fissell, W. H. and Miner, J. H. (2018). What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? *J Am Soc Nephrol*, 29(9), pp. 2262-2264.
- Floege, J. and Feehally, J. (2015). Introduction to Glomerular Disease: Clinical Presentations. In: Johnson, R. J., Feehally, J., Floege, J., ed., *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5. ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 184-197.
- Forsmark-Andrée, P., Dallner, G. and Ernster, L. (1995). Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med*, 19(6), pp. 749-57.
- Forsmark-Andrée, P. and Ernster, L. (1994). Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation. *Mol Aspects Med*, 15 Supplpp. s73-81.
- Francisco, C. C., Howarth, G. S. and Whittaker, A. L. (2015). Effects on animal wellbeing and sample quality of 2 techniques for collecting blood from the facial vein of mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54(1), pp. 76-80.
- Gbadegesin, R. A., Hall, G., Adeyemo, A., Hanke, N., Tossidou, I., Burchette, J., Wu, G., Homstad, A., Sparks, M. A., Gomez, J., Jiang, R., Alonso, A., Lavin, P., Conlon, P., Korstanje, R., Stander, M. C., Shamsan, G., Barua, M., Spurney, R., Singhal, P. C., Kopp,

- J. B., Haller, H., Howell, D., Pollak, M. R., Shaw, A. S., Schiffer, M. and Winn, M. P. (2014). Mutations in the gene that encodes the F-actin binding protein anillin cause FSGS. *J Am Soc Nephrol*, 25(9), pp. 1991-2002.
- Gee, H. Y., Ashraf, S., Wan, X., Vega-Warner, V., Esteve-Rudd, J., Lovric, S., Fang, H., Hurd, T. W., Sadowski, C. E., Allen, S. J., Otto, E. A., Korkmaz, E., Washburn, J., Levy, S., Williams, D. S., Bakkaloglu, S. A., Zolotnitskaya, A., Ozaltin, F., Zhou, W. and Hildebrandt, F. (2014). Mutations in EMP2 cause childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 94(6), pp. 884-90.
- Gee, H. Y., Sadowski, C. E., Aggarwal, P. K., Porath, J. D., Yakulov, T. A., Schueler, M., Lovric, S., Ashraf, S., Braun, D. A., Halbritter, J., Fang, H., Airik, R., Vega-Warner, V., Cho, K. J., Chan, T. A., Morris, L. G., ffrench-Constant, C., Allen, N., McNeill, H., Büscher, R., Kyrieleis, H., Wallot, M., Gaspert, A., Kistler, T., Milford, D. V., Saleem, M. A., Keng, W. T., Alexander, S. I., Valentini, R. P., Licht, C., Teh, J. C., Bogdanovic, R., Koziell, A., Bierzynska, A., Soliman, N. A., Otto, E. A., Lifton, R. P., Holzman, L. B., Sibinga, N. E., Walz, G., Tufro, A. and Hildebrandt, F. (2016). FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. *Nat Commun*, 7pp. 10822.
- Gee, H. Y., Saisawat, P., Ashraf, S., Hurd, T. W., Vega-Warner, V., Fang, H., Beck, B. B., Gribouval, O., Zhou, W., Diaz, K. A., Natarajan, S., Wiggins, R. C., Lovric, S., Chernin, G., Schoeb, D. S., Ovunc, B., Frishberg, Y., Soliman, N. A., Fathy, H. M., Goebel, H., Hoefele, J., Weber, L. T., Innis, J. W., Faul, C., Han, Z., Washburn, J., Antignac, C., Levy, S., Otto, E. A. and Hildebrandt, F. (2013). ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest*, 123(8), pp. 3243-53.
- Gee, H. Y., Zhang, F., Ashraf, S., Kohl, S., Sadowski, C. E., Vega-Warner, V., Zhou, W., Lovric, S., Fang, H., Nettleton, M., Zhu, J. Y., Hoefele, J., Weber, L. T., Podracka, L., Boor, A., Fehrenbach, H., Innis, J. W., Washburn, J., Levy, S., Lifton, R. P., Otto, E. A., Han, Z. and Hildebrandt, F. (2015). KANK deficiency leads to podocyte dysfunction and nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 125(6), pp. 2375-84.
- Glasscock, R. J. and Rule, A. D. (2012). The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. *Kidney Int*, 82(3), pp. 270-7.

- Golde, W. T., Gollobin, P. and Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)*, 34(9), pp. 39-43.
- Greka, A. and Mundel, P. (2012). Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, 74pp. 299-323.
- Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., Xie, L. X., Salviati, L., Hurd, T. W., Vega-Warner, V., Killen, P. D., Raphael, Y., Ashraf, S., Ovunc, B., Schoeb, D. S., McLaughlin, H. M., Airik, R., Vlangos, C. N., Gbadegesin, R., Hinkes, B., Saisawat, P., Trevisson, E., Doimo, M., Casarin, A., Pertegato, V., Giorgi, G., Prokisch, H., Rötig, A., Nürnberg, G., Becker, C., Wang, S., Ozaltin, F., Topaloglu, R., Bakkaloglu, A., Bakkaloglu, S. A., Müller, D., Beisert, A., Mir, S., Berdeli, A., Varpizen, S., Zenker, M., Matejas, V., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Kusakabe, T., Kispert, A., Akman, S., Soliman, N. A., Krick, S., Mundel, P., Reiser, J., Nürnberg, P., Clarke, C. F., Wiggins, R. C., Faul, C. and Hildebrandt, F. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest*, 121(5), pp. 2013-24.
- Hermle, T., Schneider, R., Schapiro, D., Braun, D. A., van der Ven, A. T., Warejko, J. K., Daga, A., Widmeier, E., Nakayama, M., Jobst-Schwan, T., Majmundar, A. J., Ashraf, S., Rao, J., Finn, L. S., Tasic, V., Hernandez, J. D., Bagga, A., Jalalah, S. M., El Desoky, S., Kari, J. A., Laricchia, K. M., Lek, M., Rehm, H. L., MacArthur, D. G., Mane, S., Lifton, R. P., Shril, S. and Hildebrandt, F. (2018). GAPVD1 and ANKFY1 Mutations Implicate RAB5 Regulation in Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 29(8), pp. 2123-2138.
- Hinkes, B., Wiggins, R. C., Gbadegesin, R., Vlangos, C. N., Seelow, D., Nürnberg, G., Garg, P., Verma, R., Chaib, H., Hoskins, B. E., Ashraf, S., Becker, C., Hennies, H. C., Goyal, M., Wharram, B. L., Schachter, A. D., Mudumana, S., Drummond, I., Kerjaschki, D., Waldherr, R., Dietrich, A., Ozaltin, F., Bakkaloglu, A., Cleper, R., Basel-Vanagaite, L., Pohl, M., Griebel, M., Tsygin, A. N., Soylu, A., Müller, D., Sorli, C. S., Bunney, T. D., Katan, M., Liu, J., Attanasio, M., O'Toole J, F., Hasselbacher, K., Mucha, B., Otto, E. A., Airik, R., Kispert, A., Kelley, G. G., Smrcka, A. V., Gudermann, T., Holzman, L. B., Nürnberg, P. and Hildebrandt, F. (2006). Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet*, 38(12), pp. 1397-405.

- Hu, H., Wang, G., Batteux, F. and Nicco, C. (2009). Gender differences in the susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury in BALB/c mice. *Tohoku J Exp Med*, 218(4), pp. 325-9.
- Imasawa, T. and Rossignol, R. (2013). Podocyte energy metabolism and glomerular diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(9), pp. 2109-18.
- International Mouse Phenotyping Consortium (2021). Gene: Coq8b, online unter <https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1924139#phenotypesTab> [abgerufen am 24.04.2021 21:28 Uhr].
- Jeanpierre, C., Denamur, E., Henry, I., Cabanis, M. O., Luce, S., Cécille, A., Elion, J., Peuchmaur, M., Loirat, C., Niaudet, P., Gubler, M. C. and Junien, C. (1998). Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am J Hum Genet*, 62(4), pp. 824-33.
- Johnson, R. J., Floege, J. and Feehally, J. (2015). Introduction to Glomerular Disease: Histologic Classification and Pathogenesis. In: Johnson, R. J., Feehally, J., Floege, J., ed., *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5. ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, pp.198-207.
- Justice, M. J. and Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis Model Mech*, 9(2), pp. 101-3.
- Kambham, N., Tanji, N., Seigle, R. L., Markowitz, G. S., Pulkkinen, L., Uitto, J. and D'Agati, V. D. (2000). Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with beta4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. *Am J Kidney Dis*, 36(1), pp. 190-6.
- Kampf, L. L., Schneider, R., Gerstner, L., Thünauer, R., Chen, M., Helmstädter, M., Amar, A., Onuchic-Whitford, A. C., Loza Munarriz, R., Berdeli, A., Müller, D., Schrezenmeier, E., Budde, K., Mane, S., Laricchia, K. M., Rehm, H. L., MacArthur, D. G., Lifton, R. P., Walz, G., Römer, W., Bergmann, C., Hildebrandt, F. and Hermle, T. (2019). TBC1D8B Mutations Implicate RAB11-Dependent Vesicular Trafficking in the Pathogenesis of Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 30(12), pp. 2338-2353.
- Kaplan, J. M., Kim, S. H., North, K. N., Rennke, H., Correia, L. A., Tong, H. Q., Mathis, B. J., Rodríguez-Pérez, J. C., Allen, P. G., Beggs, A. H. and Pollak, M. R. (2000). Mutations in

- ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 24(3), pp. 251-6.
- Kawachi, H. and Fukusumi, Y. (2020). New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria. *Clin Exp Nephrol*, 24(3), pp. 193-204.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A. and Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1(4), pp. 575-82.
- Kim, Y. H., Goyal, M., Kurnit, D., Wharram, B., Wiggins, J., Holzman, L., Kershaw, D. and Wiggins, R. (2001). Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int*, 60(3), pp. 957-68.
- Kobayashi, N., Ueno, T., Ohashi, K., Yamashita, H., Takahashi, Y., Sakamoto, K., Manabe, S., Hara, S., Takashima, Y., Dan, T., Pastan, I., Miyata, T., Kurihara, H., Matsusaka, T., Reiser, J. and Nagata, M. (2015). Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated β 1-integrin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 308(6), pp. F614-26.
- Korkmaz, E., Lipska-Zietkiewicz, B. S., Boyer, O., Gribouval, O., Fourrage, C., Tabatabaei, M., Schnaidt, S., Gucer, S., Kaymaz, F., Arici, M., Dinckan, A., Mir, S., Bayazit, A. K., Emre, S., Balat, A., Rees, L., Shroff, R., Bergmann, C., Mourani, C., Antignac, C., Ozaltin, F. and Schaefer, F. (2016). ADCK4-Associated Glomerulopathy Causes Adolescence-Onset FSGS. *J Am Soc Nephrol*, 27(1), pp. 63-8.
- Kotimaa, J., Klar-Mohammad, N., Gueler, F., Schilders, G., Jansen, A., Rutjes, H., Daha, M. R. and van Kooten, C. (2016). Sex matters: Systemic complement activity of female C57BL/6J and BALB/cJ mice is limited by serum terminal pathway components. *Mol Immunol*, 76pp. 13-21.
- Kriz, W. and Elger, M. (2015). Renal Anatomy. In: Johnson, R. J., Feehally, J., Floege, J., ed., *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5. ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 2-13.
- Kriz, W. and Lemley, K. V. (2017). Mechanical challenges to the glomerular filtration barrier: adaptations and pathway to sclerosis. *Pediatr Nephrol*, 32(3), pp. 405-417.

- Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., Makri, S., Ali-Pacha, L., Benhassine, T., Anheim, M., Lynch, D. R., Thibault, C., Plewniak, F., Bianchetti, L., Tranchant, C., Poch, O., DiMauro, S., Mandel, J. L., Barros, M. H., Hirano, M. and Koenig, M. (2008). ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet*, 82(3), pp. 661-72.
- Lahdenkari, A. T., Lounatmaa, K., Patrakka, J., Holmberg, C., Wartiovaara, J., Kestilä, M., Koskimies, O. and Jalanko, H. (2004). Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 15(10), pp. 2611-8.
- Lambers Heerspink, H. J., Gansevoort, R. T., Brenner, B. M., Cooper, M. E., Parving, H. H., Shahinfar, S. and de Zeeuw, D. (2010). Comparison of different measures of urinary protein excretion for prediction of renal events. *J Am Soc Nephrol*, 21(8), pp. 1355-60.
- Lasagni, L., Lazzeri, E., Shankland, S. J., Anders, H. J. and Romagnani, P. (2013). Podocyte mitosis - a catastrophe. *Curr Mol Med*, 13(1), pp. 13-23.
- Lemaire, M., Frémeaux-Bacchi, V., Schaefer, F., Choi, M., Tang, W. H., Le Quintrec, M., Fakhouri, F., Taque, S., Nobili, F., Martinez, F., Ji, W., Overton, J. D., Mane, S. M., Nürnberg, G., Altmüller, J., Thiele, H., Morin, D., Deschenes, G., Baudouin, V., Llanas, B., Collard, L., Majid, M. A., Simkova, E., Nürnberg, P., Rioux-Leclerc, N., Moeckel, G. W., Gubler, M. C., Hwa, J., Loirat, C. and Lifton, R. P. (2013). Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*, 45(5), pp. 531-6.
- Lexow, J., Poggioli, T., Sarathchandra, P., Santini, M. P. and Rosenthal, N. (2013). Cardiac fibrosis in mice expressing an inducible myocardial-specific Cre driver. *Dis Model Mech*, 6(6), pp. 1470-6.
- Lindström, N. O., McMahon, J. A., Guo, J., Tran, T., Guo, Q., Rutledge, E., Parvez, R. K., Saribekyan, G., Schuler, R. E., Liao, C., Kim, A. D., Abdelhalim, A., Ruffins, S. W., Thornton, M. E., Baskin, L., Grubbs, B., Kesselman, C. and McMahon, A. P. (2018). Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 29(3), pp. 785-805.

- Liu, G., Kaw, B., Kurfis, J., Rahmanuddin, S., Kanwar, Y. S. and Chugh, S. S. (2003). Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*, 112(2), pp. 209-21.
- López, L. C., Schuelke, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J., Naini, A., Dimauro, S. and Hirano, M. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*, 79(6), pp. 1125-9.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, (63), pp. e3998.
- Lovric, S., Goncalves, S., Gee, H. Y., Oskouian, B., Srinivas, H., Choi, W. I., Shril, S., Ashraf, S., Tan, W., Rao, J., Airik, M., Schapiro, D., Braun, D. A., Sadowski, C. E., Widmeier, E., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J. M., Girik, V., Capitani, G., Suh, J. H., Lachaussée, N., Arrondel, C., Patat, J., Gribouval, O., Furlano, M., Boyer, O., Schmitt, A., Vuiblet, V., Hashmi, S., Wilcken, R., Bernier, F. P., Innes, A. M., Parboosingh, J. S., Lamont, R. E., Midgley, J. P., Wright, N., Majewski, J., Zenker, M., Schaefer, F., Kuss, N., Greil, J., Giese, T., Schwarz, K., Catheline, V., Schanze, D., Franke, I., Sznajder, Y., Truant, A. S., Adams, B., Désir, J., Biemann, R., Pei, Y., Ars, E., Lloberas, N., Madrid, A., Dharnidharka, V. R., Connolly, A. M., Willing, M. C., Cooper, M. A., Lifton, R. P., Simons, M., Riezman, H., Antignac, C., Saba, J. D. and Hildebrandt, F. (2017). Mutations in sphingosine-1-phosphate lyase cause nephrosis with ichthyosis and adrenal insufficiency. *J Clin Invest*, 127(3), pp. 912-928.
- Löwik, M. M., Groenen, P. J., Pronk, I., Lilien, M. R., Goldschmeding, R., Dijkman, H. B., Levtchenko, E. N., Monnens, L. A. and van den Heuvel, L. P. (2007). Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int*, 72(10), pp. 1198-203.
- Macedo, E., Bouchard, J. and Mehta, R. L. (2015). Prevention and Nondialytic Management of Acute Kidney Injury. In: Johnson, R. J., Feehally, J., Floege, J., ed., *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5. ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 842-854.
- Malicdan, M. C. V., Vilboux, T., Ben-Zeev, B., Guo, J., Eliyahu, A., Pode-Shakked, B., Dori, A., Kakani, S., Chandrasekharappa, S. C., Ferreira, C. R., Shelestovich, N., Marek-Yagel, D.,

- Pri-Chen, H., Blatt, I., Niederhuber, J. E., He, L., Toro, C., Taylor, R. W., Deeken, J., Yardeni, T., Wallace, D. C., Gahl, W. A. and Anikster, Y. (2018). A novel inborn error of the coenzyme Q10 biosynthesis pathway: cerebellar ataxia and static encephalomyopathy due to COQ5 C-methyltransferase deficiency. *Hum Mutat*, 39(1), pp. 69-79.
- Mason, P. D. and Hoyer, P. F. (2015). Minimal Change Nephrotic Syndrome. In: Johnson, R. J., Feehally, J., Floege, J., ed., *Comprehensive Clinical Nephrology*, 5. ed, Philadelphia: Elsevier Saunders, pp. 208-217
- Mele, C., Iatropoulos, P., Donadelli, R., Calabria, A., Maranta, R., Cassis, P., Buelli, S., Tomasoni, S., Piras, R., Krendel, M., Bettoni, S., Morigi, M., Delledonne, M., Pecoraro, C., Abbate, I., Capobianchi, M. R., Hildebrandt, F., Otto, E., Schaefer, F., Macciardi, F., Ozaltin, F., Emre, S., Ibsirlioglu, T., Benigni, A., Remuzzi, G. and Noris, M. (2011). MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*, 365(4), pp. 295-306.
- Miner, J. H. (2011). Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol*, 26(9), pp. 1413-7.
- Moeller, M. J., Sanden, S. K., Soofi, A., Wiggins, R. C. and Holzman, L. B. (2002). Two gene fragments that direct podocyte-specific expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, 13(6), pp. 1561-7.
- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest*, 117(3), pp. 765-72.
- Montini, G., Malaventura, C. and Salviati, L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med*, 358(26), pp. 2849-50.
- Nagata, M. (2016). Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*, 89(6), pp. 1221-30.
- Nakane, P. K. and Pierce, G. B., Jr. (1966). Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*, 14(12), pp. 929-31.

- Neal, C. R., Crook, H., Bell, E., Harper, S. J. and Bates, D. O. (2005). Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space. *J Am Soc Nephrol*, 16(5), pp. 1223-35.
- Nicolaou, N., Margadant, C., Kevelam, S. H., Lilien, M. R., Oosterveld, M. J., Kreft, M., van Eerde, A. M., Pfundt, R., Terhal, P. A., van der Zwaag, B., Nikkels, P. G., Sachs, N., Goldschmeding, R., Knoers, N. V., Renkema, K. Y. and Sonnenberg, A. (2012). Gain of glycosylation in integrin $\alpha 3$ causes lung disease and nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 122(12), pp. 4375-87.
- Ovunc, B., Otto, E. A., Vega-Warner, V., Saisawat, P., Ashraf, S., Ramaswami, G., Fathy, H. M., Schoeb, D., Chernin, G., Lyons, R. H., Yilmaz, E. and Hildebrandt, F. (2011). Exome sequencing reveals cubilin mutation as a single-gene cause of proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 22(10), pp. 1815-20.
- Ozaltin, F., Ibsirlioglu, T., Taskiran, E. Z., Baydar, D. E., Kaymaz, F., Buyukcelik, M., Kilic, B. D., Balat, A., Iatropoulos, P., Asan, E., Akarsu, N. A., Schaefer, F., Yilmaz, E. and Bakkaloglu, A. (2011). Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*, 89(1), pp. 139-47.
- Parasuraman, S., Raveendran, R. and Kesavan, R. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother*, 1(2), pp. 87-93.
- Pavenstädt, H., Kriz, W. and Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 83(1), pp. 253-307.
- Perico, L., Conti, S., Benigni, A. and Remuzzi, G. (2016). Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 12(11), pp. 692-710.
- Philippe, A., Weber, S., Esquivel, E. L., Houbbron, C., Hamard, G., Ratelade, J., Kriz, W., Schaefer, F., Gubler, M. C. and Antignac, C. (2008). A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. *Kidney Int*, 73(9), pp. 1038-47.
- Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P. and Dworkin, L. D. (2014). The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(8), pp. 1461-9.

- Poon, W. W., Do, T. Q., Marbois, B. N. and Clarke, C. F. (1997). Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Mol Aspects Med*, 18 Supplpp. S121-7.
- Prendergast, B. J., Onishi, K. G. and Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*, 40pp. 1-5.
- Quinzii, C. M., Garone, C., Emmanuele, V., Tadesse, S., Krishna, S., Dorado, B. and Hirano, M. (2013). Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. *Faseb j*, 27(2), pp. 612-21.
- Quinzii, C. M., López, L. C., Gilkerson, R. W., Dorado, B., Coku, J., Naini, A. B., Lagier-Tourenne, C., Schuelke, M., Salviati, L., Carrozzo, R., Santorelli, F., Rahman, S., Tazir, M., Koenig, M., DiMauro, S. and Hirano, M. (2010). Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *Faseb j*, 24(10), pp. 3733-43.
- Rao, J., Ashraf, S., Tan, W., van der Ven, A. T., Gee, H. Y., Braun, D. A., Fehér, K., George, S. P., Esmaelniakooshkghazi, A., Choi, W. I., Jobst-Schwan, T., Schneider, R., Schmidt, J. M., Widmeier, E., Warejko, J. K., Hermle, T., Schapiro, D., Lovric, S., Shril, S., Daga, A., Nayir, A., Shenoy, M., Tse, Y., Bald, M., Helmchen, U., Mir, S., Berdeli, A., Kari, J. A., El Desoky, S., Soliman, N. A., Bagga, A., Mane, S., Jairajpuri, M. A., Lifton, R. P., Khurana, S., Martins, J. C. and Hildebrandt, F. (2017). Advillin acts upstream of phospholipase C $\epsilon 1$ in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 127(12), pp. 4257-4269.
- Rao, J., Liu, X., Mao, J., Tang, X., Shen, Q., Li, G., Sun, L., Bi, Y., Wang, X., Qian, Y., Wu, B., Wang, H., Zhou, W., Ma, D., Zheng, B., Shen, Y., Chen, Z., Luan, J., Wang, X., Wang, M., Dang, X., Wang, Y., Wu, Y., Hou, L., Sun, S., Li, Q., Liu, X., Bai, H., Yang, Y., Shao, X., Li, Y., Zheng, S., Han, M., Liu, C., Cao, G., Zhao, L., Qiu, S., Dong, Y., Zhu, Y., Wang, F., Zhang, D., Li, Y., Zhao, L., Yang, C., Luo, X., Chen, L., Jiang, X., Zhang, A. and Xu, H. (2019). Genetic spectrum of renal disease for 1001 Chinese children based on a multicenter registration system. *Clin Genet*, 96(5), pp. 402-410.

- Rudnicki, M., Mayr, J. A., Zschocke, J., Antretter, H., Regele, H., Feichtinger, R. G., Windpessl, M., Mayer, G. and Pözl, G. (2016). MELAS Syndrome and Kidney Disease Without Fanconi Syndrome or Proteinuria: A Case Report. *Am J Kidney Dis*, 68(6), pp. 949-953.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), pp. 1350-4.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, 14(4), pp. 381-92.
- Schünke, M., Schulte, E., Schuhmacher, U., Voll and M., Wesker, K. (2015). Prometheus Innere Organe: Lernatlas der Anatomie, 4. ed., Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Sethi, S., Fervenza, F. C., Zhang, Y. and Smith, R. J. (2012). Secondary focal and segmental glomerulosclerosis associated with single-nucleotide polymorphisms in the genes encoding complement factor H and C3. *Am J Kidney Dis*, 60(2), pp. 316-21.
- Shankland, S. J. (2006). The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 69(12), pp. 2131-47.
- Shimojo, H. (1998). Adaptation and distortion of podocytes in rat remnant kidney. *Pathol Int*, 48(5), pp. 368-83.
- Silbernagel, S., Despopoulos, A. (2012). Taschenatlas Physiologie, 8. ed., Stuttgart: Georg Thieme.
- Solanki, A. K., Widmeier, E., Arif, E., Sharma, S., Daga, A., Srivastava, P., Kwon, S. H., Hugo, H., Nakayama, M., Mann, N., Majmundar, A. J., Tan, W., Gee, H. Y., Sadowski, C. E., Rinat, C., Becker-Cohen, R., Bergmann, C., Rosen, S., Somers, M., Shril, S., Huber, T. B., Mane, S., Hildebrandt, F. and Nihalani, D. (2019). Mutations in KIRREL1, a slit diaphragm component, cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 96(4), pp. 883-889.
- Sondheimer, N., Hewson, S., Cameron, J. M., Somers, G. R., Broadbent, J. D., Ziosi, M., Quinzii, C. M. and Naini, A. B. (2017). Novel recessive mutations in COQ4 cause severe infantile

- cardiomyopathy and encephalopathy associated with CoQ(10) deficiency. *Mol Genet Metab Rep*, 12pp. 23-27.
- Takemoto, M., Asker, N., Gerhardt, H., Lundkvist, A., Johansson, B. R., Saito, Y. and Betsholtz, C. (2002). A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*, 161(3), pp. 799-805.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), pp. 4350-4354.
- Trautmann, A., Lipska-Ziętkiewicz, B. S. and Schaefer, F. (2018). Exploring the Clinical and Genetic Spectrum of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome: The PodoNet Registry. *Front Pediatr*, 6pp. 200.
- Trautmann, A., Vivarelli, M., Samuel, S., Gipson, D., Sinha, A., Schaefer, F., Hui, N. K., Boyer, O., Saleem, M. A., Feltran, L., Müller-Deile, J., Becker, J. U., Cano, F., Xu, H., Lim, Y. N., Smoyer, W., Anochie, I., Nakanishi, K., Hodson, E. and Haffner, D. (2020). IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 35(8), pp. 1529-1561.
- Trimarchi, H. and Coppo, R. (2019). Podocytopathy in the mesangial proliferative immunoglobulin A nephropathy: new insights into the mechanisms of damage and progression. *Nephrol Dial Transplant*, 34(8), pp. 1280-1285.
- Vazquez Fonseca, L., Doimo, M., Calderan, C., Desbats, M. A., Acosta, M. J., Cerqua, C., Cassina, M., Ashraf, S., Hildebrandt, F., Sartori, G., Navas, P., Trevisson, E. and Salviati, L. (2018). Mutations in COQ8B (ADCK4) found in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome alter COQ8B function. *Hum Mutat*, 39(3), pp. 406-414.
- Vivante, A., Chacham, O. S., Shril, S., Schreiber, R., Mane, S. M., Pode-Shakked, B., Soliman, N. A., Koneth, I., Schiffer, M., Anikster, Y. and Hildebrandt, F. (2019). Dominant PAX2 mutations may cause steroid-resistant nephrotic syndrome and FSGS in children. *Pediatr Nephrol*, 34(9), pp. 1607-1613.
- Vivante, A. and Hildebrandt, F. (2016). Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology*, 12(3), pp. 133-146.

- Vogelmann, S. U., Nelson, W. J., Myers, B. D. and Lemley, K. V. (2003). Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(1), pp. F40-8.
- Wang, L., Ellis, M. J., Gomez, J. A., Eisner, W., Fennell, W., Howell, D. N., Ruiz, P., Fields, T. A. and Spurney, R. F. (2012). Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney Int*, 81(11), pp. 1075-85.
- Wang, Y. and Hekimi, S. (2016). Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol*, 26(5), pp. 367-378.
- Wang, Y., Smith, C., Parboosingh, J. S., Khan, A., Innes, M. and Hekimi, S. (2017). Pathogenicity of two COQ7 mutations and responses to 2,4-dihydroxybenzoate bypass treatment. *J Cell Mol Med*, 21(10), pp. 2329-2343.
- Warejko, J. K., Tan, W., Daga, A., Schapiro, D., Lawson, J. A., Shril, S., Lovric, S., Ashraf, S., Rao, J., Hermle, T., Jobst-Schwan, T., Widmeier, E., Majmundar, A. J., Schneider, R., Gee, H. Y., Schmidt, J. M., Vivante, A., van der Ven, A. T., Ityel, H., Chen, J., Sadowski, C. E., Kohl, S., Pabst, W. L., Nakayama, M., Somers, M. J. G., Rodig, N. M., Daouk, G., Baum, M., Stein, D. R., Ferguson, M. A., Traum, A. Z., Soliman, N. A., Kari, J. A., El Desoky, S., Fathy, H., Zenker, M., Bakkaloglu, S. A., Müller, D., Noyan, A., Ozaltin, F., Cadnapaphornchai, M. A., Hashmi, S., Hopcian, J., Kopp, J. B., Benador, N., Bockenbauer, D., Bogdanovic, R., Stajić, N., Chernin, G., Ettenger, R., Fehrenbach, H., Kemper, M., Munarriz, R. L., Podracka, L., Büscher, R., Serdaroglu, E., Tasic, V., Mane, S., Lifton, R. P., Braun, D. A. and Hildebrandt, F. (2018). Whole Exome Sequencing of Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13(1), pp. 53-62.
- Widmeier, E., Airik, M., Hugo, H., Schapiro, D., Wedel, J., Ghosh, C. C., Nakayama, M., Schneider, R., Awad, A. M., Nag, A., Cho, J., Schueler, M., Clarke, C. F., Airik, R. and Hildebrandt, F. (2019). Treatment with 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Prevents FSGS Progression and Renal Fibrosis in Podocyte-Specific Coq6 Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol*, 30(3), pp. 393-405.
- Widmeier, E., Yu, S., Nag, A., Chung, Y. W., Nakayama, M., Fernández-Del-Río, L., Hugo, H., Schapiro, D., Buerger, F., Choi, W. I., Helmstädter, M., Kim, J. W., Ryu, J. H., Lee, M. G., Clarke, C. F., Hildebrandt, F. and Gee, H. Y. (2020). ADCK4 Deficiency Destabilizes

- the Coenzyme Q Complex, Which Is Rescued by 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 31(6), pp. 1191-1211.
- Wiggins, J. E., Goyal, M., Sanden, S. K., Wharram, B. L., Shedden, K. A., Misek, D. E., Kuick, R. D. and Wiggins, R. C. (2005). Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol*, 16(10), pp. 2953-66.
- Wiggins, R. C. (2007). The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int*, 71(12), pp. 1205-14.
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M. and Rosenberg, P. B. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), pp. 1801-4.
- Yang, Y., Muzny, D. M., Reid, J. G., Bainbridge, M. N., Willis, A., Ward, P. A., Braxton, A., Beuten, J., Xia, F., Niu, Z., Hardison, M., Person, R., Bekheirnia, M. R., Leduc, M. S., Kirby, A., Pham, P., Scull, J., Wang, M., Ding, Y., Plon, S. E., Lupski, J. R., Beaudet, A. L., Gibbs, R. A. and Eng, C. M. (2013). Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*, 369(16), pp. 1502-11.
- Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Wühl, E., Cochat, P., Bouvier, R., Kraus, C., Mark, K., Madlon, H., Dötsch, J., Rascher, W., Maruniak-Chudek, I., Lennert, T., Neumann, L. M. and Reis, A. (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*, 13(21), pp. 2625-32.

Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Hannah Hugo versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Podozyten-spezifischer Adck4-Knockout verursacht ein nephrotisches Syndrom und führt zum progredienten Nierenversagen selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Publikation 1: Widmeier, E., Yu, S., Nag, A., Chung, Y. W., Nakayama, M., Fernández-Del-Río, L., Hugo, H., Schapiro, D., Buerger, F., Choi, W. I., Helmstädter, M., Kim, J. W., Ryu, J. H., Lee, M. G., Clarke, C. F., Hildebrandt, F. & Gee, H. Y. (2020). ADCK4 Deficiency Destabilizes the Coenzyme Q Complex, Which Is Rescued by 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 31(6), 1191-1211.

Beitrag im Einzelnen: aus meiner Arbeit an der Mäusestudie sind die Abbildungen 1A für die Monate 8-11, Abb. 1B für die Monate 2-10, die Ergänzungsabbildungen 1E, 1F, 1G, 1H für die Monate 3-10, die Ergänzungsabbildungen 3 A-C (Kontrollgruppe male und female, *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* male und female) und die Ergänzungsabbildung 6A *Nphs2.Cre⁺;Adck4^{flox/flox}* Mäuse für die Monate 8-11 entstanden.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- 2020 Klämbt, V., Mao, Y., Schneider, R., Buerger, F., Shamseldin, H., Onuchic-Whitford, A. C., Deutsch, K., Kitzler, T. M., Nakayama, M., Majmundar, A. J., Mann, N., Hugo, H., Widmeier, E., Tan, W., Rehm, H. L., Mane, S., Lifton, R. P., Alkuraya, F. S., Shril, S., Hildebrandt, F. (2020). Generation of Monogenic Candidate Genes for Human Nephrotic Syndrome Using 3 Independent Approaches. *Kidney Int Rep*, 6(2), pp. 460-471.
- Marquez, J., Mann, N., Arana, K., Deniz, E., Ji, W., Konstantino, M., Mis, E. K., Deshpande, C., Jeffries, L., McGlynn, J., Hugo, H., Widmeier, E., Konrad, M., Tasic, V., Morotti, R., Baptista, J., Ellard, S., Lakhani, S. A., Hildebrandt, F., Khokha, M. K. (2020). DLG5 variants are associated with multiple congenital anomalies including ciliopathy phenotypes. *J Med Genet*, jmedgenet-2019-106805.
- Widmeier, E., Yu, S., Nag, A., Chung, Y. W., Nakayama, M., Fernández-Del-Río, L., Hugo, H., Schapiro, D., Buerger, F., Choi, W. I., Helmstädter, M., Kim, J. W., Ryu, J. H., Lee, M. G., Clarke, C. F., Hildebrandt, F. and Gee, H. Y. (2020). ADCK4 Deficiency Destabilizes the Coenzyme Q Complex, Which Is Rescued by 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 31(6), pp. 1191-1211.
- 2019 Solanki, A. K., Widmeier, E., Arif, E., Sharma, S., Daga, A., Srivastava, P., Kwon, S. H., Hugo, H., Nakayama, M., Mann, N., Majmundar, A. J., Tan, W., Gee, H. Y., Sadowski, C. E., Rinat, C., Becker-Cohen, R., Bergmann, C., Rosen, S., Somers, M., Shril, S., Huber, T. B., Mane, S., Hildebrandt, F. and Nihalani, D. (2019). Mutations in KIRREL1, a slit diaphragm component, cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 96(4), pp. 883-889.
- Braun, D. A., Warejko, J. K., Ashraf, S., Tan, W., Daga, A., Schneider, R., Hermle, T., Jobst-Schwan, T., Widmeier, E., Majmundar, A. J., Nakayama, M., Schapiro, D., Rao, J., Schmidt, J. M., Hoogstraten, C. A., Hugo, H., Bakkaloglu, S. A., Kari, J. A., El Desoky, S., Daouk, G., Mane, S., Lifton, R. P., Shril, S. and Hildebrandt, F. (2019). Genetic variants in the LAMA5 gene in pediatric nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 34(3), pp. 485-493.

Widmeier, E., Airik, M., Hugo, H., Schapiro, D., Wedel, J., Ghosh, C. C., Nakayama, M., Schneider, R., Awad, A. M., Nag, A., Cho, J., Schueler, M., Clarke, C. F., Airik, R. and Hildebrandt, F. (2019). Treatment with 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Prevents FSGS Progression and Renal Fibrosis in Podocyte-Specific Coq6 Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol*, 30(3), pp. 393-405.

Mann, N., Braun, D. A., Amann, K., Tan, W., Shril, S., Connaughton, D. M., Nakayama, M., Schneider, R., Kitzler, T. M., van der Ven, A. T., Chen, J., Ityel, H., Vivante, A., Majmundar, A. J., Daga, A., Warejko, J. K., Lovric, S., Ashraf, S., Jobst-Schwan, T., Widmeier, E., Hugo, H., Mane, S. M., Spaneas, L., Somers, M. J. G., Ferguson, M. A., Traum, A. Z., Stein, D. R., Baum, M. A., Daouk, G. H., Lifton, R. P., Manzi, S., Vakili, K., Kim, H. B., Rodig, N. M., Hildebrandt F. (2019). Whole-Exome Sequencing Enables a Precision Medicine Approach for Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*, 30(2), pp. 201-215.

2018

Braun, D. A., Lovric, S., Schapiro, D., Schneider, R., Marquez, J., Asif, M., Hussain, M. S., Daga, A., Widmeier, E., Rao, J., Ashraf, S., Tan, W., Lusk, C. P., Kolb, A., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J. M., Hoogstraten, C. A., Eddy, K., Kitzler, T. M., Shril, S., Moawia, A., Schrage, K., Khayyat, A. I. A., Lawson, J. A., Gee, H. Y., Warejko, J. K., Hermle, T., Majmundar, A. J., Hugo, H., Budde, B., Motameny, S., Altmüller, J., Noegel, A. A., Fathy, H. M., Gale, D. P., Waseem, S. S., Khan, A., Kerecuk, L., Hashmi, S., Mohebbi, N., Ettenger, R., Serdaroğlu, E., Alhasan, K. A., Hashem, M., Goncalves, S., Ariceta, G., Ubetagoyena, M., Antonin, W., Baig, S. M., Alkuraya, F. S., Shen, Q., Xu, H., Antignac, C., Lifton, R. P., Mane, S., Nürnberg, P., Khokha, M. K. and Hildebrandt, F. (2018). Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 128(10), pp. 4313-4328.

van der Ven, A. T., Connaughton, D. M., Ityel, H., Mann, N., Nakayama, M., Chen, J., Vivante, A., Hwang, D. Y., Schulz, J., Braun, D. A., Schmidt, J. M., Schapiro, D., Schneider, R., Warejko, J. K., Daga, A., Majmundar, A. J., Tan, W., Jobst-Schwan, T., Hermle, T., Widmeier, E., Ashraf, S., Amar, A., Hoogstraaten, C. A., Hugo, H., Kitzler, T. M., Kause, F., Kolvenbach, C. M., Dai, R., Spaneas, L., Amann, K., Stein, D. R., Baum, M. A., Somers, M. J. G., Rodig, N. M., Ferguson, M. A., Traum, A. Z., Daouk, G. H., Bogdanović, R., Stajić, N., Soliman, N. A.,

Kari, J. A., El Desoky, S., Fathy, H. M., Milosevic, D., Al-Saffar, M., Awad, H. S., Eid, L. A., Selvin, A., Senguttuvan, P., Sanna-Cherchi, S., Rehm, H. L., MacArthur, D. G., Lek, M., Laricchia, K. M., Wilson, M. W., Mane, S. M., Lifton, R. P., Lee, R. S., Bauer, S. B., Lu, W., Reutter, H. M., Tasic, V., Shril, S., Hildebrandt, F. (2018). Whole-Exome Sequencing Identifies Causative Mutations in Families with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. *J Am Soc Nephrol*, 29(9), pp. 2348-2361.

Braun, D. A., Shril, S., Sinha, A., Schneider, R., Tan, W., Ashraf, S., Hermle, T., Jobst-Schwan, T., Widmeier, E., Majmundar, A. J., Daga, A., Warejko, J. K., Nakayama, M., Schapiro, D., Chen, J., Airik, M., Rao, J., Schmidt, J. M., Hoogstraten, C. A., Hugo, H., Meena, J., Lek, M., Laricchia, K. M., Bagga, A., Hildebrandt F. (2018). Mutations in WDR4 as a new cause of Galloway–Mowat syndrome. *Am J Med Genet A*, 176(11), pp. 2460-2465.

Posterpräsentationen

2018 Hugo H, Widmeier E, Shril S, Hildebrandt F
Thema: „*GAS2L2* as a candidate gene for nephrotic syndrome.“
Poster zum ASN Kongress Oktober 2018, San Diego, USA

Widmeier E, Nakayama M, Hugo H, Yu S, Gee H Y, Hildebrandt F
Thema: „2,4-Dihydroxybenzoic Acid Improves Survival and Demonstrates a Renoprotective Effect in a Podocyte-Specific Coq8b-Knockout Mouse Model of Nephrotic Syndrome“
Poster zum ASN Kongress Oktober 2018, San Diego, USA

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich auf dem Weg begleiteteten.

Prof. Dr. med. Friedhelm Hildebrandt danke ich für die außergewöhnliche Erfahrung in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit erstellen zu dürfen und an vielen weiteren spannenden Projekten beteiligt worden zu sein. Besonders geschätzt habe ich Ihre ständige Erreichbarkeit und Nahbarkeit, Ihre ansteckende Begeisterung für die Genetik und Ihre Bemühung für Zusammenhalt und gute Stimmung im Team.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. Dominik Müller danken für seine gute Betreuung und seine Unterstützung bei meiner Bewerbung um ein Stipendium für meine Auslandserfahrung. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Besonders möchte ich mich bei Dr. med. Eugen Widmeier bedanken für die exzellente Einarbeitung in die experimentelle Methodik. Ich habe viel gelernt und vor allem die freundschaftliche Zusammenarbeit sehr genossen. Vielen Dank ebenso für das Korrekturlesen der Promotionsarbeit und die Unterstützung auch noch nach der gemeinsamen Zeit in Prof. Dr. med. Hildebrandts Labor.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in Prof. Dr. med. Hildebrandts Arbeitsgruppe für die Hilfe und das nette Miteinander bedanken.

Vielen Dank auch an Rick J. Johnson für eine Ausgabe seines Buches Comprehensive Clinical Nephrology, welches mir mit seinen schönen Abbildungen und gut verständlichen Texten den Einstieg in das spannende und komplexe Thema der glomerulären Erkrankungen sehr erleichterte. Abschließend bin ich meinen Freunden und meiner Familie sehr dankbar für ihre Unterstützung, die aufmunternden Gespräche und den kritischen Blick auf meine Rechtschreibung.